

Université de Montréal

**Caractérisation de la voie de signalisation du récepteur des
minéralocorticoïdes dans le rein fœtal suite à une
restriction de croissance intrautérine**

Par :

Ève Mailhot-Daye

Département de physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)
en physiologie moléculaire, cellulaire et intégrative

Décembre 2013

© Ève Mailhot-Daye, 2013

Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation de la voie de signalisation du récepteur des
minéralocorticoïdes dans le rein fœtal suite à une
restriction de croissance intrautérine**

Présenté par :

Ève Mailhot-Daye

A été évalué par un jury composé des membres suivants :

Lucie Parent, PhD

Président-rapporteur

Michèle Brochu, PhD

Directrice de recherche

Benoît Boivin, PhD

Membre du jury

Résumé

La restriction de croissance intrautérine (RCIU) est associée à l'apparition de maladies à l'âge adulte et le phénotype de la condition pathologique peut être différent selon le sexe. Notre laboratoire a développé un modèle de RCIU chez le rat en administrant une diète faible en sodium lors du dernier tiers de la gestation entraînant une réduction de l'expansion volémique maternelle et de la perfusion utéroplacentaire. L'activité rénine et la concentration d'aldostérone plasmatique sont augmentées chez la mère et les fœtus RCIU. Antérieurement, notre laboratoire a démontré une augmentation de l'expression génique et protéique rénale de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase-}\alpha_1$ uniquement chez les fœtus femelles RCIU. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que la diminution du volume circulant chez la rate gestante entraîne une augmentation et une expression différentielle, selon le sexe, des éléments de la cascade de signalisation du récepteur des minéralocorticoïdes (MR) dans les reins de fœtus RCIU. L'expression des gènes est réalisée par qRT-PCR et celle des protéines par immunobuvardage de type Western. Bien que les résultats démontrent que la transcription génique de SGK1, α -ENaC et GILZ soit augmentée dans les reins de fœtus RCIU, l'expression protéique de SGK1, pSGK1(Thr 256) et α -ENaC est similaire à celle des témoins. La protéine GILZ est indétectable. Pour CNKSR3, aucune différence de l'ARNm ou de la protéine n'a été observée entre les deux groupes. Par contre, même si l'expression génique du MR n'est pas différente, l'expression protéique est diminuée chez les RCIU. Aucun effet du sexe n'a été observé. En conclusion, l'augmentation d'aldostérone plasmatique chez les fœtus ayant subi une RCIU stimule la transcription des gènes associés à la voie de réabsorption sodique, mais la quantité protéique demeure inchangée. Ceci suggère qu'il peut avoir des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle ou une dégradation accélérée des protéines. Malgré la pertinence du sexe dans le développement de maladies, le sexe n'influence pas l'expression des composantes de la voie de rétention sodique chez le fœtus. Il serait important de suivre cette voie en fonction de l'âge et de corrélérer les expressions génique et protéique avec l'apparition de maladies.

Mots-clés : Programmation fœtale, plasticité développementale, aldostérone, diète pauvre en sodium, canal sodique.

Abstract

Intrauterine growth restriction (IUGR) contributes to the development of diseases in adulthood, of which some are influenced by sex. Our laboratory has developed an IUGR model in the rat by administering a low-sodium diet during the last third of gestation which leads to a reduced volume expansion and uteroplacental perfusion. Plasma renin activity (PRA) and aldosterone concentration are increased in IUGR dams and foetuses. Previously, our laboratory has shown that gene and protein expression of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase-}\alpha_1$ was increased solely in female IUGR kidneys. Therefore, we hypothesize that the reduced maternal volume will result in an increase and differential expression, influenced by foetal sex, of elements from the mineralocorticoid receptor (MR) pathway. Gene expression is determined by qRT-PCR and for protein, Western blotting is performed. Although results show that gene expression of SGK1, $\alpha\text{-ENaC}$ and GILZ is increased in IUGR foetal kidneys, protein expression for SGK1, pSGK1 (Thr256), and $\alpha\text{-ENaC}$ is similar to controls. GILZ protein is not detected. For CNKSR3, no difference in mRNA or protein expression is observed between the groups. Gene expression of MR is unchanged, while its protein expression is decreased in IUGR foetuses. In conclusion, the increase in plasma aldosterone in IUGR foetuses stimulates gene transcription of several components of the sodium reabsorption pathway without affecting protein expression. These results suggest that there may be post-transcriptional regulation or a higher protein turnover. Despite the importance of biological sex in the development of disease, it did not affect the expression of elements from the sodium reabsorption pathway in the foetus. It would be important to verify this same pathway in animals of different ages to correlate gene and protein expression with the appearance of diseases.

Keywords: Foetal programming, developmental plasticity, aldosterone, low-sodium diet, sodium channel.

Table des matières

| | |
|---|------|
| PAGE DE PRÉSENTATION DU MÉMOIRE | i |
| PAGE DE PRÉSENTATION DU JURY | ii |
| RÉSUMÉ ET MOTS-CLÉS | iii |
| ABSTRACT AND KEYWORDS | v |
| TABLES DES MATIÈRES | vi |
| LISTE DES FIGURES | viii |
| LISTE DES TABLEAUX DE L'ARTICLE | ix |
| LISTE DES FIGURES DE L'ARTICLE | x |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | xi |
| DÉDICACE | xiv |
| REMERCIEMENTS | xv |
| | |
| 1. INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 La programmation fœtale | 2 |
| 1.2 Restriction de croissance intrautérine | 4 |
| 1.2.1 Modèles de RCIU | 5 |
| 1.2.2 Modèle de RCIU développé en laboratoire | 6 |
| 1.3 Le rein | 7 |
| 1.3.1 Développement | 7 |
| 1.3.1.1 Humain | 7 |
| 1.3.1.2 Rat | 8 |

| | |
|---|--------|
| 1.3.2 Morphologie et Anatomie | 10 |
| 1.3.2.1 Corpuscule rénal..... | 11 |
| 1.3.2.2 Tubules rénaux | 12 |
| 1.3.2.3 Appareil juxta-glomérulaire | 14 |
| 1.3.3 Fonction rénale..... | 14 |
| 1.3.3.1 Filtration glomérulaire..... | 15 |
| 1.3.3.2 Transport tubulaire | 16 |
| 1.3.4 Rétroaction tubuloglomérulaire | 18 |
| 1.3.5 Effet de la restriction de croissance intrautérine (RCIU) | 18 |
| 1.4 Système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) | 20 |
| 1.4.1 Aldostérone | 21 |
| 1.4.1.1 Rôle dans la réabsorption sodique..... | 22 |
| 1.5 Influence du sexe biologique..... | 24 |
| 1.6 Hypothèse et objectifs de travail | 25 |
| 2. ARTICLE..... | 27 |
| 2.1 Résumé de l'article en français | 29 |
| 2.2 Manuscrit..... | 31 |
| 2.3 Résultats supplémentaires | 63 |
| 3. DISCUSSION | 64 |
| 3.1 La voie des minéralocorticoïdes chez les fœtus RCIU..... | 65 |
| 3.2 Limites expérimentales | 69 |
| 3.3 Perspectives | 70 |
| 4. BIBLIOGRAPHIE | 72 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Régulation maternelle du développement et de la programmation fœtale | 3 |
| Figure 2. Développement du néphron..... | 9 |
| Figure 3. Anatomie interne du rein | 10 |
| Figure 4. Structure et composants du corpuscule rénal et de l'appareil juxta-glomérulaire.... | 11 |
| Figure 5. Structure du néphron | 13 |
| Figure 6. Gradient osmotique..... | 16 |
| Figure 7. Système rénine-angiotensine-aldostérone | 20 |
| Figure 8. Signalisation rénale intracellulaire | 23 |
| Figure 9. Schématisation du complexe régulateur d'ENaC en présence d'aldostérone | 24 |
| Figure 10. Expression protéique de lamine B1 | 63 |
| Figure 11. Signalisation intracellulaire rénale selon le modèle expérimental de RCIU | 64 |

Liste des tableaux de l'article

| | |
|--|----|
| Table 1. Primer designs used for RT-PCR..... | 52 |
| Table 2. QIAGEN Primers for qRT-PCR | 52 |
| Table 3. Western Blot conditions for all proteins | 53 |

Liste des figures de l'article

| | |
|---|----|
| Figure 1. Gene and protein expression of MR [<i>Nr3c2</i>] | 56 |
| Figure 2. Gene and protein expression of SGK1 [<i>Sgk1</i>]..... | 57 |
| Figure 3. Gene and protein expression of α -ENaC [<i>Scnn1a</i>]..... | 58 |
| Figure 4. Gene and protein expression of CNKSR3 [<i>Cnksr3</i>]..... | 59 |
| Figure 5. Gene expression of GILZ [<i>Tsc22d3</i>] | 60 |
| Figure 6. Gene and protein expression of Na ⁺ -K ⁺ -ATPase α_1 [<i>Atp1a1</i>]..... | 61 |
| Figure 7. Gene and protein expression of Na ⁺ -K ⁺ -ATPase β_1 [<i>Atp1b1</i>]..... | 62 |

Liste des abréviations

| | |
|-------------------|--|
| 11 β HSD2 | 11 β -hydroxystéroïde deshydrogénase (type 2) |
| ACE | Enzyme de conversion de l'angiotensine - <i>Angiotensin converting enzyme</i> |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| Af9 | Gène ALL1 fusionné à partir du chromosome 9 – <i>ALL1-fused gene from chromosome 9</i> |
| aMLC-1 | Chaîne légère de la myosine de l'atrium – <i>Atrial myosin light chain 1</i> |
| AMPc | Adénosine monophosphate cyclique |
| Ang I | Angiotensine I |
| Ang II | Angiotensine II |
| ANP | Peptide natriurétique auriculaire – <i>Atrial natriuretic peptide</i> |
| AQP | Aquaporine |
| ARNm | Acide ribonucléique messenger |
| ASDN | Néphron distal sensible à l'aldostérone – <i>Aldosterone-sensitive distal nephron</i> |
| AT ₁ R | Récepteur de l'angiotensine II de type I – <i>Angiotensin II type I receptor</i> |
| AT ₂ R | Récepteur de l'angiotensine II de type II – <i>Angiotensin II type II receptor</i> |
| Bax | Protéine X associée à Bcl-2 – <i>Bcl-2-associated X protein</i> |
| Bcl-2 | Protéine associée avec le lymphome à cellules B 2 – <i>B-cell lymphoma 2 associated protein</i> |
| Ca ²⁺ | Ion calcium |
| Cl ⁻ | Ion chlore |
| CNKSR3 | Connecteur activateur de la kinase suppresseur de Ras, isoforme 3 – <i>Connector enhancer of kinase suppressor of Ras, isoform 3</i> |
| <i>Cnksr3</i> | Gène de CNKSR3 – <i>CNKSR3 gene</i> |
| CYP | Cytochrome P450 |

| | |
|---|---|
| Dot1a | Perturbateur de repression télomérique, variant d'épissage a – <i>Disruptor of telomeric silencing alternative splice variant a</i> |
| ENaC | Canal épithélial sodique – <i>Epithelial sodium channel</i> |
| ERC | Complexe régulateur d'ENaC – <i>EnaC regulatory complex</i> |
| ERK | Kinase régulée par des signaux extracellulaires – <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> |
| GILZ | Glissière à leucine induite par les glucocorticoïdes – <i>Glucocorticoid-induced leucine zipper</i> |
| HRE | Élément de réponse aux hormones – <i>Hormone response element</i> |
| HSP | Protéine de choc thermique – <i>Heat shock protein</i> |
| K ⁺ | Ion potassium |
| kDa | kiloDalton |
| MEK | Protéine kinase de la protéine kinase activée par un mitogène – <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> |
| Mg ²⁺ | Ion magnésium |
| mmHg | millimètre de mercure |
| MR | Récepteur des minéralocorticoïdes – <i>Mineralocorticoid receptor</i> |
| Na ⁺ | Ion sodium |
| Na ⁺ -K ⁺ -ATPase | Pompe sodium-potassium adénosine triphosphatase – <i>Sodium-potassium adenosine triphosphatase pump</i> |
| Na ⁺ Cl ⁻ | Chlorure de sodium |
| NCC | Cotransporteur sodium/chlore – <i>Sodium/chloride cotransporter</i> |
| NEDD4-2 | Protéine ubiquitine-ligase E3 – <i>Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2, E3 ubiquitin protein ligase</i> |
| NHE | Échangeur sodium/proton – <i>Sodium/proton exchanger</i> |
| NKCC2 | Cotransporteur sodium-potassium-chlore – <i>Sodium/potassium/chloride cotransporter</i> |
| nmol/L | Nanomole par litre |
| NO | Monoxyde d'azote – <i>Nitric oxide</i> |
| PCR | Réaction en chaîne par polymérase – <i>Polymerase chain reaction</i> |

| | |
|-----------------|--|
| PDK1 | Kinase phosphoinositide-dépendante 1 – <i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i> |
| PDK2 | Kinase phosphoinositide-dépendante 2 – <i>Phosphoinositide-dependent kinase-2</i> |
| PGE2 | Prostaglandine E2 |
| PKC | Protéine kinase C |
| PKD | Protéine kinase D |
| pmol/L | Picomole par litre |
| PRA | Activité rénine plasmatique – <i>Plasma renin activity</i> |
| pSGK1 (Thr 256) | Kinase induite par le sérum et les glucocorticoïdes, isoforme 1 (phosphorylé à thréonine 256) – <i>Serum- and glucocorticoid-induced kinase, isoform 1 (phosphorylated at threonine 256)</i> |
| qRT-PCR | Réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel – <i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i> |
| RAF | Kinase de la famille RAF (Fibrosarcome rapidement accéléré) – <i>RAF family kinase (Rapidly accelerated fibrosarcoma)</i> |
| RCIU | Restriction de croissance intrautérine |
| ROMK | Canal potassium de la médulla externe rénale – <i>Renal outer medullary potassium channel</i> |
| <i>Scnn1a</i> | Gène de la sous-unité alpha 1 du canal épithélial sodique non-voltage-dépendant – <i>Sodium channel, non-voltage-gated 1 alpha subunit</i> |
| SGK1 | Kinase induite par le sérum et les glucocorticoïdes, isoforme 1 – <i>Serum- and glucocorticoid-induced kinase, isoform 1</i> |
| <i>Sgk1</i> | Gène de SGK1 – <i>SGK1 gene</i> |
| SRAA | Système rénine-angiotensine-aldostérone |
| TCD | Tubule contourné distal |
| TCP | Tubule contourné proximal |
| TFG | Taux de filtration glomérulaire |
| <i>Tsc22d3</i> | Gène de GILZ, membre 3 de la famille du domaine TSC22 – <i>GILZ gene, TSC22 domain family, member 3</i> |

*À mon père,
malgré ton absence,
je sais que tu serais fier.*

Remerciements

Un énorme merci à Michèle Brochu, ma directrice de recherche, pour m'avoir acceptée dans son équipe et qui m'a proposé un projet intéressant. Elle a toujours cru en mes capacités et m'a fait confiance pendant la durée de mon projet. Merci pour les nombreux commentaires, idées et encouragements durant les deux dernières années.

Je tiens à remercier Benoit Sicotte pour ses conseils et son aide technique durant mon projet ainsi que ses commentaires constructifs lors de ma rédaction. À mes collègues de laboratoire, Cynthia, Émilie et Yasmine. Il y a deux ans, je débutais ma maîtrise sans les connaître et maintenant je quitte avec tellement de bons moments et de souvenirs que je garderai pour toujours. Sans elles, l'atmosphère du laboratoire n'aurait pas été pareille.

Je remercie Alexandre, mon amoureux, pour tout l'encouragement, le soutien, l'écoute, la patience et l'attention qu'il m'a accordés durant mes études. Il m'a laissée tracer mon parcours même en sachant que ce ne sera pas facile. Il m'a toujours encouragée à atteindre mes objectifs et je lui en suis reconnaissante. Je t'aime!

To my family, I thank them all for being there and believing in me even at times when I doubted myself. They have always expressed how proud they are of me. Without their support, it would have been a lonely road. I love you all!

Merci à tous ceux et celles que j'ai croisés lors de mon parcours académique qui m'ont influencée, aidée, écoutée...

1. Introduction

Le développement fœtal requiert de l'énergie provenant de la mère, des nutriments ainsi qu'un environnement utérin sain. Plusieurs facteurs peuvent influencer ces besoins de façon négative. Il est connu que certaines substances (i.e. drogues, alcool) ont de graves répercussions sur le développement intellectuel et physique d'un enfant à court et à long terme. Par contre, l'effet d'un environnement intrautérin défavorable n'est pas complètement compris. La recherche entreprise au cours de mes études a permis d'explorer un modèle de restriction de croissance intrautérine (RCIU) et les conséquences de cet environnement défavorable sur un organe en particulier : le rein. Dans cet ouvrage, une base théorique de la programmation fœtale et du rein ainsi que des explications spécifiques à mon projet seront décrites. Ensuite, les résultats seront présentés sous forme de manuscrit. Ce travail se conclura par une discussion générale du projet et des perspectives intéressantes.

1.1. La programmation fœtale

La théorie de la programmation fœtale, communément appelée l'hypothèse de Barker, a été décrite en 1992 par le chercheur David J. P. Barker (Hales and Barker 1992). Elle stipule que l'environnement intrautérin dans lequel croît le fœtus peut le prédisposer à certaines maladies à l'âge adulte. Cette théorie découle du lien qu'il a noté entre la pression artérielle élevée et le petit poids à la naissance de personnes âgées de 10 et 36 ans dans une cohorte anglaise (Barker, Osmond et al. 1989). Par la suite, il a mis en évidence le rapport entre les tailles fœtale et placentaire et l'apparition des maladies cardiovasculaires à l'âge adulte. Notamment qu'un petit fœtus ayant un gros placenta exhibait un plus haut taux de pression artérielle rendu l'âge adulte (Barker, Bull et al. 1990), précurseur important pour l'hypertension. La composante centrale de l'hypothèse de Barker est la dénutrition fœtale; condition qui peut dériver de l'état de santé ou nutritionnel de la mère, la fonction placentaire ou le génome fœtal. Des changements physiologiques chez le fœtus prennent place afin d'assurer sa survie et accommoder ce manque de nutriments (Fig. 1) (Godfrey and Barker 2007). Le fœtus essaie de s'adapter à son environnement par ces mécanismes d'adaptation, mais ceux-ci ne seront pas optimaux pour sa vie postnatale. Depuis l'annonce de la théorie de la programmation fœtale, l'épigénétique est devenu un domaine fascinant et grandissant. Il est

maintenant admis que la nutrition maternelle est un élément qui affecte l'épigénome fœtale (Mathers and McKay 2009). Plusieurs nutriments sont des donneurs de groupes méthyl, alors un apport insuffisant peut avoir des conséquences au niveau de l'ADN. En effet, le génome reçoit l'information de son environnement pour ensuite l'enregistrer sous forme de marques épigénétiques. La méthylation d'ADN et les modifications post-translationnelles des histones peuvent augmenter ou diminuer l'expression des gènes du génome. Le concept de programmation fœtale touche plusieurs systèmes physiologiques, dont les systèmes reproducteur (Rhind, Rae et al. 2001), cardiaque (Sehgal, Doctor et al. 2013) et rénal (Vehaskari, Aviles et al. 2001, Cheng, Lozano et al. 2012, Vaccari, Mesquita et al. 2013), ainsi que l'adaptation menant aux dysfonctions métaboliques (Somm, Vauthay et al. 2012). Les avances scientifiques sur ce sujet pourront mener à des traitements préventifs afin de minimiser les conséquences sur le fœtus dans l'environnement utérin et au cours de sa vie.

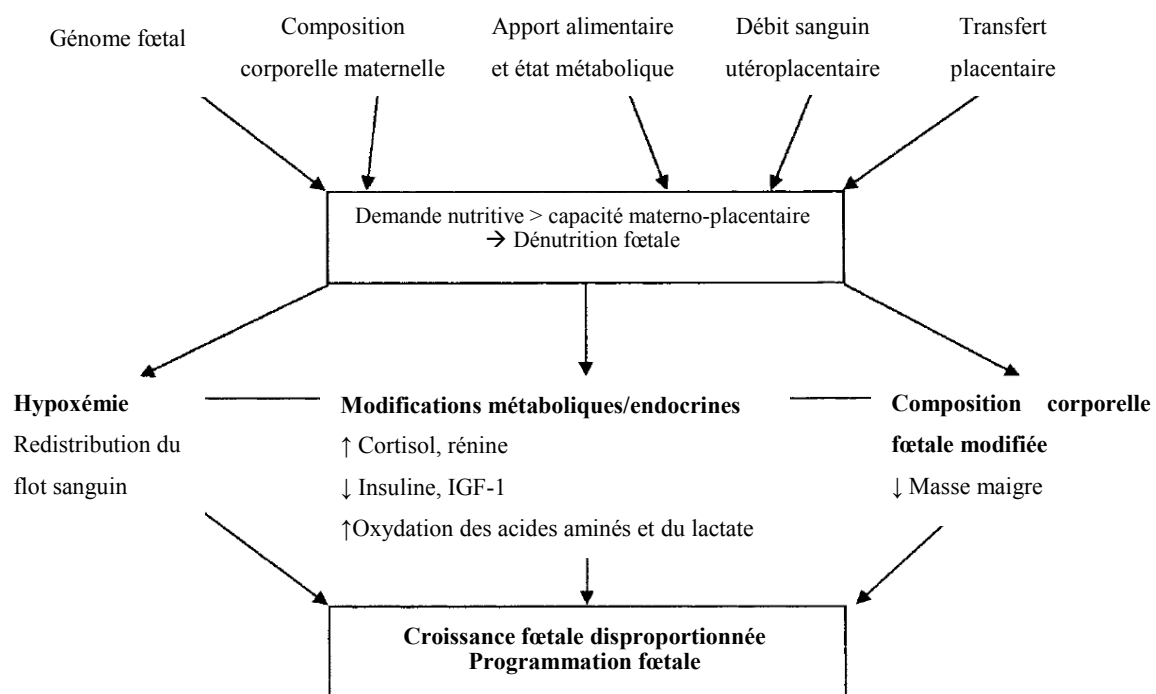


Figure 1. Régulation maternelle du développement et de la programmation fœtale. IGF-1 : Facteur de croissance similaire à l'insuline 1 – *Insulin-like growth factor 1*. (Adapté de Godfrey and Barker 2007)

1.2. Restriction de croissance intrautérine

On définit la restriction de croissance intrautérine (RCIU) par la mesure d'un poids fœtal inférieur au 10^e percentile pour l'âge gestationnel et d'un fœtus n'ayant pas atteint le plein potentiel de croissance individuel (American College of and Gynecologists 2013). L'incidence de la RCIU varie entre 5 et 10% dans les pays occidentaux (OECD 2011, Martin 2013), mais peut atteindre un taux supérieur dans les pays en voie de développement (de Onis, Blossner et al. 1998). L'étiologie de la RCIU découle de facteurs maternels, placentaires ou fœtaux (Brodsky and Christou 2004) apparaissant tout au long de la gestation. La nutrition inadéquate maternelle et l'insuffisance du transfert placentaire, affectant le transport de nutriments au fœtus, sont les causes les plus rapportées. Deux types de RCIU ont été définis, soit la RCIU asymétrique et la RCIU symétrique. D'abord, tel que son nom l'indique, la RCIU asymétrique se caractérise par des mesures anthropométriques inégales. Elle se présente par le manque de croissance lors du dernier tiers de la gestation (humain : 3^e trimestre; rat : 3^e semaine) et est le type de RCIU le plus répandu (Visentin, Bertin et al. 2012). Chez l'humain, des mesures de la circonférence du crâne et de l'abdomen, le diamètre crânien et la taille du fémur (Militello, Pappalardo et al. 2009) sont des indicateurs anténataux de la RCIU. Dans un contexte d'insuffisance placentaire où l'apport nutritif est inadéquat, le fœtus met en place des mécanismes d'adaptation, qui à ce jour ne sont pas tous compris. Parmi ceux-ci se trouve la redistribution du flot sanguin. Le flot est alors redirigé vers le cerveau afin d'assurer sa croissance et les organes viscéraux ou abdominaux recevront un flot sanguin diminué. Des états de santé précaire dès le début de la gestation ou des malformations congénitales peuvent induire une RCIU de type symétrique (Brodsky and Ouellette 2008). Ce type est plus rare que la RCIU asymétrique, mais elle présente un plus haut taux de mortalité et/ou de morbidité puisque le cerveau reçoit moins de sang et de nutriments.

Des études rétrospectives ou prospectives chez l'humain ont été établies afin de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation et les conséquences de la RCIU à long terme. Une étude italienne a déterminé que des fœtus humains qui montrent une RCIU ont une paroi aortique plus épaisse que les fœtus ayant une croissance appropriée. Cette différence était encore apparente à l'âge de 18 mois (Zanardo, Fanelli et al. 2011). Dans une cohorte

irlandaise, la proportion de personnes de 50 ans ayant une pression artérielle élevée ou prenant des médicaments à cet effet est plus élevée lorsqu'ils sont nés avec une restriction de croissance (Spence, Stewart et al. 2012). De plus, la RCIU augmenterait le risque de mortalité due à l'ischémie cardiaque chez des hommes suédois (Leon, Lithell et al. 1998). Ces exemples démontrent les conséquences à long terme de la RCIU chez des sujets adultes.

1.2.1. Modèles de RCIU

Plusieurs modèles animaux expérimentaux ont été utilisés pour mieux comprendre les conséquences d'une RCIU. Par exemple, une diète maternelle pauvre en protéines entraînera une augmentation de la pression artérielle (Bertram, Trowern et al. 2001, Bogdarina, Welham et al. 2007), une diminution de la longévité (Martin-Gronert, Tarry-Adkins et al. 2008), des altérations de la fonction rénale (Sahajpal and Ashton 2003), du métabolisme (Alexandre-Gouabau, Courant et al. 2011, Vo, Revesz et al. 2013) et de l'épigénome (Sohi, Marchand et al. 2011, Zeng, Gu et al. 2013) à différents stade de la vie. De plus, la RCIU induite par des diètes hypocaloriques confirme également des changements au niveau des marques épigénétiques de l'ADN (Chen, Ganguly et al. 2013) et de la sécrétion d'insuline (Yuan, Zhou et al. 2010). Bien que des diètes différentes soient utilisées, elles ont toutes un impact sur le fœtus et son adaptation postnatale.

Par ailleurs, il existe des modèles chirurgicaux pouvant induire la RCIU tels que la ligature des artères utérines ou l'ablation d'une corne utérine. Ces modèles miment l'insuffisance placentaire caractéristique de la RCIU chez l'humain afin de comprendre l'effet de la RCIU sur le fœtus. Des études montrent le lien entre une fonction placentaire diminuée et des mécanismes modifiés privilégiant le développement de l'hypertension (Alexander 2003, Baserga, Bares et al. 2009). Chez le mouton, la majorité des caroncules utérines sont enlevées pour réduire la fonction et la taille placentaires. Les agneaux RCIU ont plus de masse grasse à 45 jours de vie augmentant leur risque d'obésité (De Blasio, Gatford et al. 2007). Également, la capacité de néoglucogénèse hépatique augmente (Thorn, Regnault et al. 2009), altérant ainsi le métabolisme de la progéniture. Toutes les méthodes utilisées démontrent que

l'environnement utérin défavorable peut mener à des changements fœtaux persistant même après la naissance.

1.2.2. Modèle de RCIU développé en laboratoire

Dans le but de mieux clarifier les adaptations moléculaires, cellulaires et physiologiques, le groupe du Dr Brochu a développé un modèle de RCIU chez la rate. La RCIU est induite en administrant une diète faible en sodium durant le dernier tiers de la gestation (i.e. du 15^e au 22^e jour d'un terme de 23 jours). Plusieurs paramètres physiologiques sont changés chez les rates et leurs ratons. D'abord, cette diète induit une réduction de l'expansion volémique et du diamètre des artères utérines arquées normalement observés durant la grossesse (Roy-Clavel, Picard et al. 1999, St-Louis, Sicotte et al. 2006); menant conséquemment à la baisse de la perfusion utéroplacentaire. Cette modification physiologique est observée chez des femmes souffrant de prééclampsie ou d'une restriction de croissance fœtale (Salas, Marshall et al. 2006). Les rates dites « RCIU » présentent également une augmentation de l'activité rénine plasmatique (PRA) et du taux plasmatique d'aldostérone; deux composants du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) (Roy-Clavel, Picard et al. 1999). Le poids placentaire associé à une RCIU est diminué; de concert avec la réduction de perfusion utéroplacentaire, ces modifications réduisent l'apport de nutriments aux fœtus.

La RCIU de notre modèle expérimental est du type asymétrique. Malgré un poids corporel inférieur, les fœtus RCIU ont un cerveau et un cœur du même poids que leurs pairs témoins. Par contre, le poids rénal diminue. Cette observation démontre qu'il y a une redistribution du flot sanguin pour irriguer le cerveau et le cœur afin d'assurer leur croissance, au détriment du rein (Battista, Oigny et al. 2002). Il y a également l'activation du SRAA, justifié par l'augmentation d'ARNm de l'enzyme cytochrome P450 aldostérone synthase (CYP), du récepteur d'angiotensine II de type I (AT₁R) ainsi que le taux d'aldostérone plasmatique élevé (Bibeau, Battista et al. 2010). Les enzymes de la néoglucogénèse rénales sont augmentées, suggérant une production de substrat pour combler le manque de nutriments chez le fœtus (Khoury 2010). Avec la hausse d'aldostérone, l'expression de la Na⁺-K⁺-ATPase est modifiée; le gène et la protéine de la sous-unité α_1 sont augmentés chez les fœtus femelles

tandis que l'expression du gène de la sous-unité β_1 est augmentée chez les deux sexes (Gagnon 2007).

À l'âge de 12 semaines, les rates nées avec une RCIU démontrent des signes de remodelage cardiaque dont une augmentation du volume des cardiomyocytes et une diminution de leur contractilité. De plus, il y a réexpression des gènes de l'ANP et aMLC-1 qui sont normalement détectés chez le fœtus uniquement (Battista, Calvo et al. 2005). Ces animaux ont une pression systolique plus élevée d'environ 10 mmHg comparativement aux témoins. Les taux d'urée et de créatinine plasmatiques augmentés suggèrent une atteinte de la filtration glomérulaire à l'âge adulte (Battista, Oligny et al. 2002). Des résultats préliminaires montrent aussi que les rats nés RCIU ont une dilatation aortique réduite à la puberté (5 semaines) et à l'âge adulte (12 et 20 semaines). Cette observation confirme que les conséquences d'une RCIU sont présentes dans plusieurs systèmes chez l'animal à l'âge adulte.

Comme modèle animal, le rat reflète bien les changements hémodynamiques normalement observés chez la femme lors de la grossesse (Dowell and Kauer 1997). La RCIU asymétrique induite au 15^e jour (correspondant au 2^e trimestre chez l'humain) est similaire à celle observée chez l'humain.

1.3. Le rein

1.3.1. Développement

1.3.1.1. Humain

Chez l'humain, le développement rénal prend place *in utero* et est complet à la 36^e semaine de gestation. Avant d'être complètement formé, trois stades successifs de développement sont nécessaires: le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros. Débutant vers le 21^e jour après la conception, le pronéphros est une structure rudimentaire qui n'est présent que quelques jours (Woolf, Winyard et al. 2003). Il régresse, laissant ensuite la place pour le développement du mésonéphros vers le 24^e jour embryonnaire. Ce dernier a la capacité

de fonctionner chez l'embryon, mais cette structure est transitoire et ses cellules formeront les glandes surrénales et les gonades. À leur tour, les conduits mésonéphriques deviendront les canaux de Wolff. Le mésonéphros disparaît complètement après la 16^e semaine de gestation. À la 5^e semaine de gestation, le métanéphros fait son apparition (Moritz and Wintour 1999). Ceci est le dernier stade du développement rénal et sera le rein tel que nous le connaissons dans l'anatomie humaine. D'abord, les bourgeons urétéraux et le blastème métanéphrogène émettent des signaux réciproques pour la formation rénale (Saxén and Sariola 1987). Les bourgeons urétéraux migrent vers le blastème métanéphrogène pour former une structure en *T*, précurseur de tous les tubules collecteurs. Ensuite, les bourgeons urétéraux causent l'agrégat des cellules du blastème métanéphrogène et leur structuration en vésicule. Ceci marque le début de la formation de la vésicule rénale, le néphron primitif. Cette structure s'allonge en forme de virgule et ensuite en *S* pour fusionner avec la portion distale des bourgeons urétéraux, créant ainsi le lien vers le tubule collecteur. Une artériole migrant vers la portion proximale cause l'invagination de la structure pour créer la capsule de Bowman et le glomérule (Fig. 2). À ce point, le néphron est fonctionnel et filtre le sang fœtal. Plusieurs nouveaux néphrons se forment, grâce à la ramification des bourgeons urétéraux, dans la zone néphrogénique, jusqu'à la dernière partie du 3^e trimestre. Cette zone consiste en la partie extérieure du cortex rénal qui agglomère les néphrons immatures. La partie intérieure ou médullaire comporte les néphrons déjà en cours de développement, donc plus matures.

1.3.1.2. Rat

Le développement rénal chez le rat est similaire à celui de l'humain sauf pour le développement. Il suit les mêmes étapes et voit les stades du pronéphros, du mésonéphros et du métanéphros. Par contre, le développement débute environ au 12^e jour de la période embryonnaire et se poursuit jusqu'au 10^e jour post-natal (Dickinson, Walker et al. 2005). Le mésonéphros se forme pendant les jours 12 à 17 post-coïtaux (Rodeck and Whittle 2009). Quant au métanéphros, son développement débute pendant ces mêmes journées jusqu'à terme. Tous les tubules rénaux sont présents à l'exception de l'anse de Henlé, qui se développe dans les jours postnataux (Cha, Kim et al. 2001) et certains autres s'allongent (Little and McMahon

2012). La différence entre le rein d'un raton naissant et celui à l'âge de 10 jours confirment que la néphrogénèse *ex utero* est un processus important (El-gammal, Ibrahim et al. 2010).

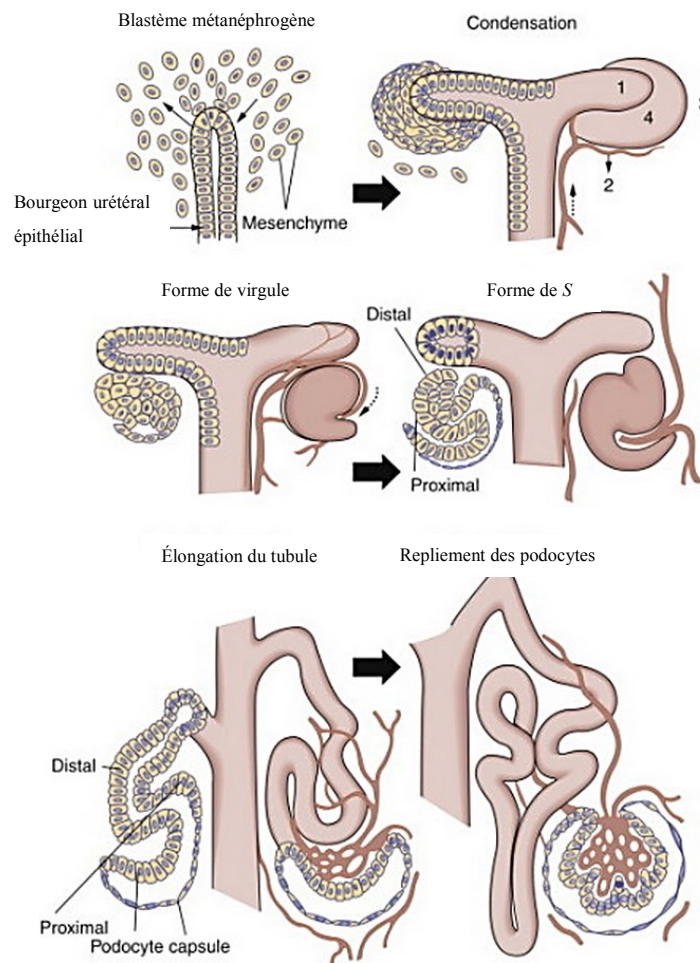


Figure 2. Développement du néphron. Le blastème métanéphrogène se condense sur le bourgeon urétéral pour former un tubule primitif en forme de virgule. Son développement lui permet d'acquérir une forme en S. Le tubule s'allonge et les artérioles permettent le repliement des podocytes. L'axe proximal-distal est déjà établi. (Adapté de Brenner and Rector 2008)

1.3.2. Morphologie et Anatomie

Le rein est un organe présent en paire. Sa structure se divise en trois parties : le cortex, la médulla et le bassinet. Le cortex est la partie extérieure recouvrant la médulla. Chez l'humain, la médulla se compose de 8 à 18 pyramides rénales et forme la majeure partie des tubules rénaux (Brenner and Rector 2008). Chez le rat, il y a présence d'une seule pyramide rénale. Le bassinet rénal est l'allongement de l'uretère qui se rend dans le rein; cette partie reçoit l'urine des calices adjacents aux pyramides rénales. Le rein reçoit le flot sanguin via l'artère rénale qui se divisera en petites ramifications, artérioles et capillaires. Le sang veineux ressort du rein par la veine rénale. Le point de rencontre de l'uretère et des vaisseaux sanguins au rein se nomme le hile rénal (Fig. 3). Le rein est innervé par le plexus rénal découlant des nerfs splanchiques lombaires. L'unité fonctionnelle du rein est le néphron, composé du corpuscule rénal et de segments tubulaires. En moyenne, l'humain possède 1 million de néphrons tandis que le rat en a 30,000. Lorsque le néphron s'enfonce profondément dans la médulla, il est caractérisé comme juxtamédullaire. S'il effleure la médulla, sans y pénétrer, il est superficiel (Johnson and Byrne 2003).

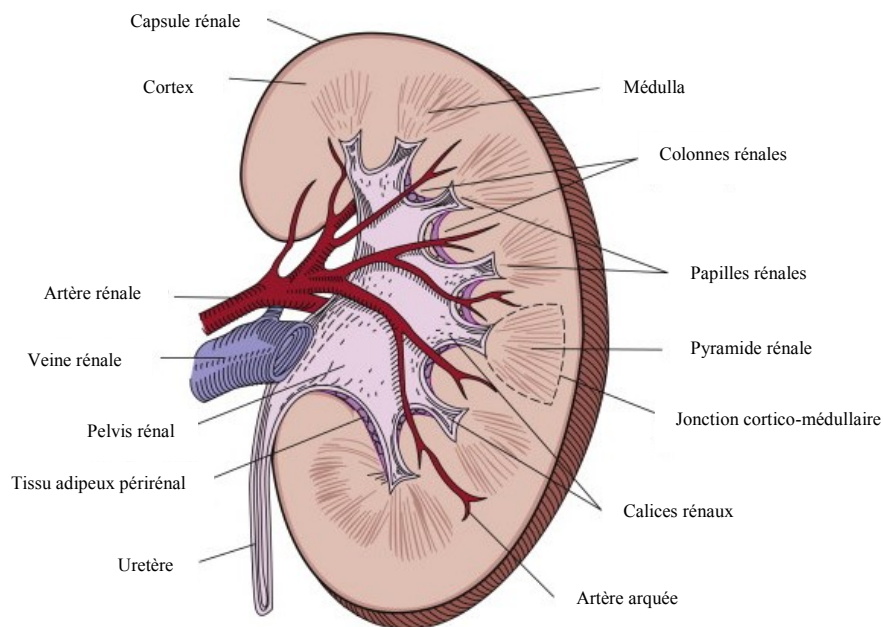


Figure 3. Anatomie interne du rein. (Adapté de Brenner and Rector 2008)

1.3.2.1. Corpuscule rénal

La capsule de Bowman et le glomérule forment le corpuscule rénal (Fig. 4). La capsule de Bowman est une continuation des tubules proximaux tandis que le glomérule est le réseau de capillaires qui y rentrent. Le corpuscule rénal contient plusieurs types de cellules, dont des cellules endothéliales, mésangiales, viscérales (épithéliales) et pariétales. D'abord, les cellules endothéliales forment une couche mince fenestrée dans les capillaires. Cette fenestration rend le capillaire perméable aux petites molécules, telles que les ions, et à l'eau; elle constitue donc une première barrière à franchir avant la filtration (Brenner and Rector 2008). Ensuite, les cellules mésangiales, formant le mésangium, entourent les capillaires présents dans le corpuscule. Elles sécrètent la matrice extracellulaire, jouent un rôle structural et contractile

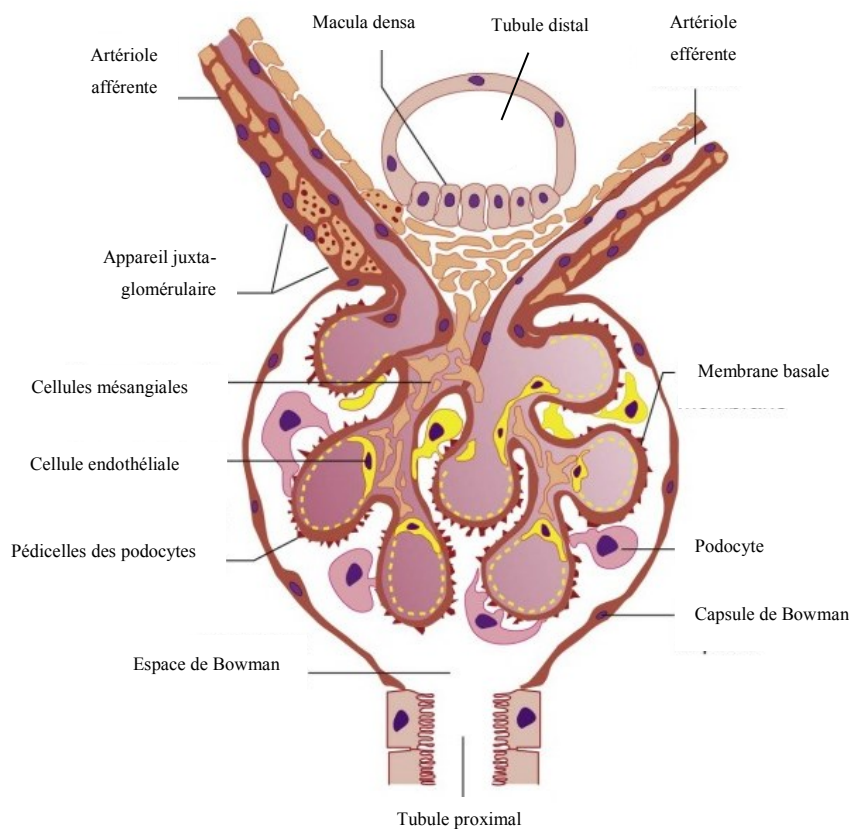


Figure 4. Structure et composants du corpuscule rénal et de l'appareil juxtaglomérulaire. (Adapté de Cecil 2012)

aidant dans la filtration glomérulaire. Quant à elles, les cellules viscérales, ou épithéliales, forment le feuillet viscéral de la capsule de Bowman. Ces cellules sont mieux connues sous le nom de podocytes, puisqu'elles sont capables de former des pédicelles ou « pieds » pour s'allonger autour du capillaire et créer des espaces appelés fentes de filtration (Marieb 2005). Ces fentes agissent comme seconde barrière et permettront au filtrat glomérulaire d'accéder à l'espace de Bowman (ou chambre glomérulaire). Le feuillet pariétal de la capsule de Bowman est composé d'une seule couche de cellules pariétales qui semble avoir un simple rôle de structure (Brenner and Rector 2008). La membrane basale du glomérule agit comme barrière intermédiaire entre les podocytes et les cellules endothéliales (Vize, Woolf et al. 2003).

1.3.2.2. Tubules rénaux

Dès le développement du mésonéphros au stade embryonnaire, il existe un axe proximal-distal dans le tubule en forme de *S*. Cette structure donne naissance aux segments tubulaires du néphron fonctionnel (Dudek 2013). Les cellules des tubules rénaux sont dites « polarisées », car elles possèdent une membrane apicale, du côté de la lumière tubulaire, et une membrane basolatérale, faisant face au milieu interstitiel. Les capillaires péri-tubulaires sont du côté basolatéral et reçoivent les molécules et substrats réabsorbés des tubules. Entre les cellules, il y a présence de jonctions paracellulaires caractérisées soit comme serrées, soit comme lâches. Ce caractère influence la perméabilité du tubule à l'eau et aux solutés. Globalement, le néphron débute comme étant un épithélium lâche pour ensuite finir en épithélium serré.

La première portion se nomme le tubule proximal et est divisé en 3 portions : S1, S2 et S3. Le tubule contourné proximal (TCP) débute à S1 et termine à S2, tandis que le tubule droit proximal (TDP) n'est qu'une petite portion du S2 et du S3. Le terme proximal désigne leur position par rapport au corpuscule rénal. Ces tubules reçoivent le filtrat glomérulaire directement de l'espace de Bowman et se chargent de la majeure partie de la réabsorption d'eau, du glucose, des acides aminés et du sodium. Les cellules épithéliales du TCP sont de forme cuboïde et présentent une bordure en brosse du côté luminal afin d'augmenter la surface de contact. Ensuite le tubule devient plus étroit et se nomme la branche descendante de l'anse

de Henlé, composée de cellules minces. Cette section tubulaire est la seule qui entre en contact avec la médulla. L'anse de Henlé continue et devient la branche ascendante mince et la branche ascendante large. Cette dernière partie contient des cellules rappelant celles du TCP, soit cuboïdes et larges. La branche ascendante large est caractérisée par des cellules lisses et rugueuses (Brenner and Rector 2008). Le tubule contourné distal (TCD) est le lieu de la fine régulation de la réabsorption de sodium et la sécrétion de potassium. Cette portion du néphron revient en contact avec le corpuscule dont il est originaire. Dans les tubules connecteurs et collecteurs, il existe des cellules principales et intercalaires; ces dernières jouant un rôle important dans l'équilibre acido-basique (Kim, Kim et al. 1999, McDougal, Wein et al. 2011). Les cellules principales sont responsables de l'absorption et la sécrétion d'ions sodiques et potassiques, respectivement. Ces tubules acheminent l'urine vers le bassinnet rénal pour excrétion.

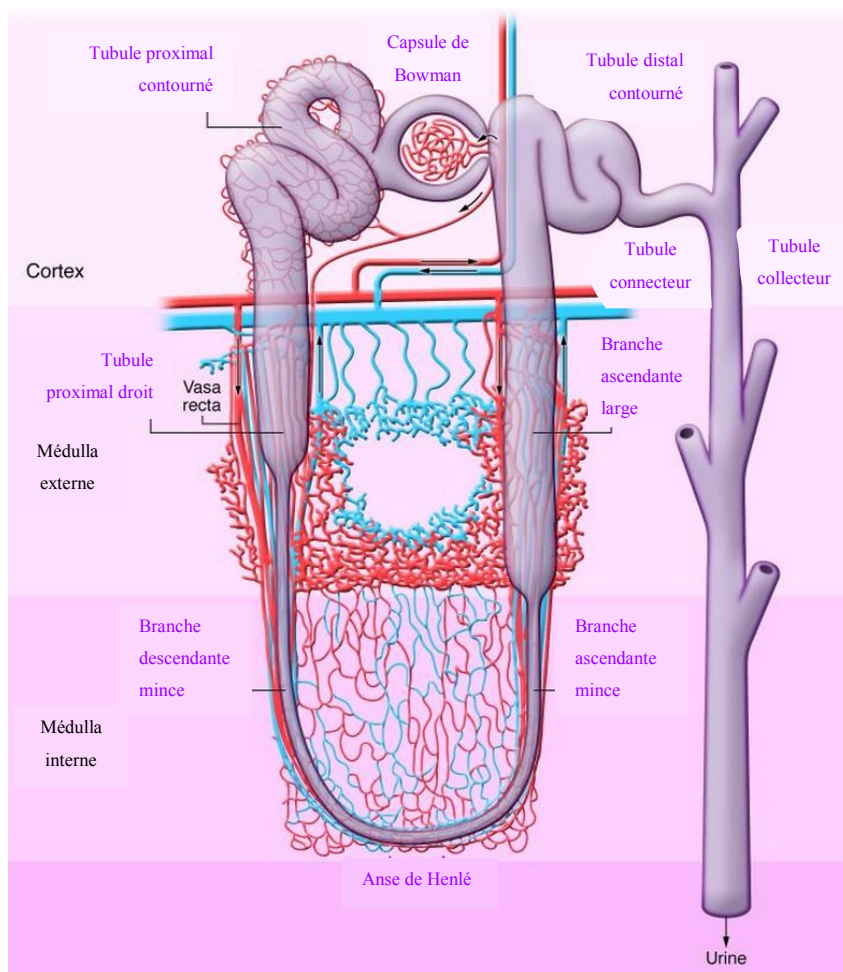


Figure 5. Structure du néphron. Schématisation des portions du néphron et les vaisseaux sanguins irrigant les tubules. (Adapté de Bonventre and Yang 2011)

1.3.2.3. Appareil juxta-glomérulaire

Malgré l'importance du corpuscule et des tubules rénaux dans la filtration et la réabsorption, l'appareil juxta-glomérulaire joue un rôle déterminant dans l'homéostasie sodique. Il se forme à l'endroit où le TCD revient à son corpuscule d'origine (Fig. 4). Cet appareil possède deux rôles importants : l'induction d'une vasoconstriction de l'artériole afférente et la relâche de rénine (Peti-Peterdi and Harris 2010). Les artérioles afférentes et efférentes sont entourées de cellules juxta-glomérulaires (ou granulaires). Le point de contact de ces cellules avec le TCD forme la macula densa. Cette zone se caractérise par la présence de cellules intégrées dans le TCD, mais qui ont des propriétés et une morphologie distinctes. Entre autres, ces cellules jouent le rôle de chimiorécepteurs, capables de détecter les variations de solutés dans le filtrat glomérulaire et d'ajuster en conséquence la résistance vasculaire des artérioles afférentes (Marieb 2005). Ce processus est nommé la rétroaction tubuloglomérulaire et sera abordé dans la section suivante.

En réponse aux variations de sel alimentaire dans la diète, l'expression de la rénine et le nombre de cellules juxta-glomérulaires peuvent être modifiées (Machura, Neubauer et al. 2012). Ces cellules adaptent leur phénotype en fonction des concentrations circulantes de chlorure de sodium; lorsque l'homéostasie est interrompue, elles deviennent des cellules sécrétrices de rénine. En revanche, lorsque cet enzyme n'est pas nécessaire, elles peuvent se transformer en cellules musculaires lisses, mésangiales ou épithéliales (Sequeira Lopez, Pentz et al. 2004).

1.3.3. Fonction rénale

Les reins ont pour fonction d'éliminer les déchets métaboliques, d'assurer le transport des solutés et des nutriments et maintenir l'équilibre acido-basique. Chez l'humain, le rein filtre 180L de plasma sanguin par jour, mais ne perd qu'un litre par jour dans l'urine. Plusieurs protéines membranaires, signaux extracellulaires et intracellulaires sont responsables de la fonction rénale. Lors du stade fœtal, le rein participe au maintien du liquide amniotique en produisant une urine diluée (Moritz and Wintour 1999).

1.3.3.1. Filtration glomérulaire

La filtration glomérulaire au niveau du corpuscule rénal se produit grâce aux différentes pressions hydrostatiques et osmotiques (ou oncotiques) dans les capillaires sanguins. La pression oncotique est une forme de pression osmotique exercée par la présence de protéines dans le liquide. L'effet de ces différentes pressions est expliqué par la loi de Frank-Starling, initialement décrite pour les capillaires sanguins (Rennke, Denker et al. 2007). Le sang est acheminé au corpuscule rénal via l'artériole afférente qui se ramifie en capillaires. La pression hydrostatique dans ces derniers est supérieure aux deux pressions qui l'opposent : soit les pressions hydrostatique et oncotique exercées par le milieu interstitiel (espace de Bowman). Cette différence de pression favorise la sortie de l'eau, des molécules et des ions du plasma sanguin pour franchir la barrière de filtration. À l'autre extrémité du glomérule, la pression oncotique est plus élevée que la pression hydrostatique du capillaire. Cette réversion de pression favorisera la rentrée de l'eau dans le glomérule. Cette étape de la fonction rénale est non sélective puisque maintes molécules, ions et l'eau passent les capillaires pour se retrouver dans l'espace de Bowman.

Il existe des méthodes afin de calculer le taux de filtration glomérulaire (TFG) dans le but de déceler des anomalies pouvant mener à l'insuffisance rénale. Une substance, connue pour être filtrée et excrétée à 100% par les reins, telle que l'inuline, est administrée et la quantité retrouvée dans l'urine permet de calculer le TFG. Par contre, l'inuline est désormais moins utilisée puisqu'elle doit être administrée par voie intraveineuse (McDougal, Wein et al. 2011). Une autre méthode simple est d'évaluer la clairance de créatinine, substance endogène relativement stable chez un individu. Elle est mesurée par sa présence dans une collecte urinaire pendant 24 heures. La créatinine est normalement excrétée par le système urinaire; donc si le taux de créatinine dans l'urine est bas, le TFG l'est aussi; confirmant ainsi une filtration glomérulaire sous-optimale. En parallèle, il est possible de vérifier sa présence sanguine, qui peut être signe de défaillance rénale.

1.3.3.2. Transport tubulaire

Les tubules rénaux sont responsables de réabsorber 99% de l'eau et du sodium, la totalité du bicarbonate et la majorité du potassium venant du plasma sanguin. Chaque portion tubulaire a des capacités différentes en termes de transport et de sélectivité. Le gradient osmotique qui se crée tout au long du néphron aide au transport membranaire des tubules impliqués (Fig. 6). Le néphron distal sensible à l'aldostérone (ASDN) regroupe les tubules contournés distaux, connecteurs et collecteurs. Sous l'influence hormonale, il contrôle la fine régulation de l'équilibre sodique. La polarité des cellules épithéliales des tubules contribuent au transport vectoriel des électrolytes.

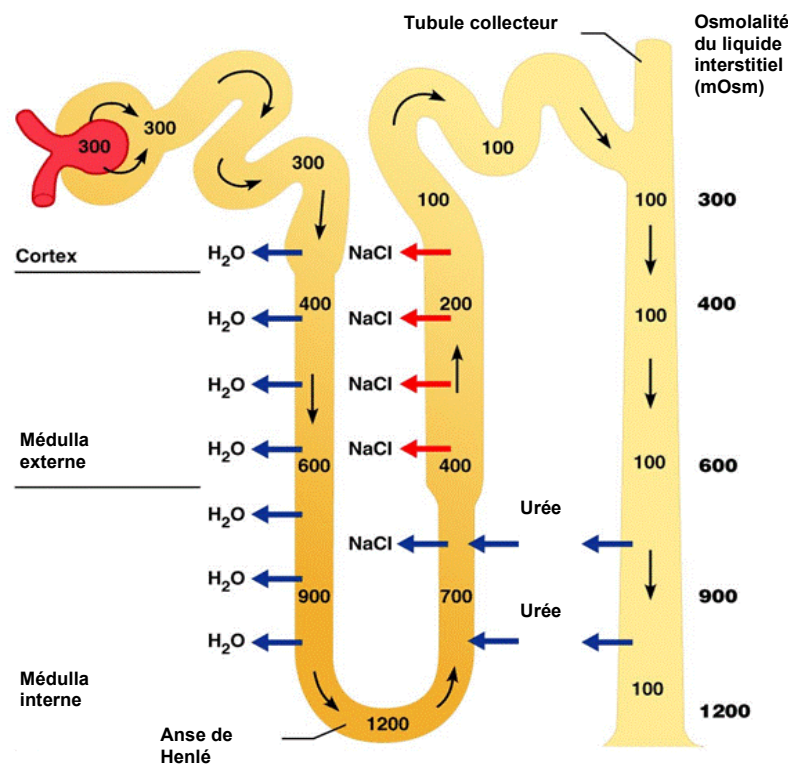


Figure 6. Gradient osmotique (Adapté de Marieb 2005)

Le tubule contourné proximal (TCP) est le segment qui reçoit directement le filtrat glomérulaire et réabsorbe la totalité des nutriments, la majeure partie des ions ainsi que 65% du Na^+Cl^- et, conséquemment de manière passive, l'eau. Les aquaporines (AQP) sont les protéines impliquées dans le transport de l'eau; dans cette portion tubulaire c'est l'AQP1 qui se charge de ce rôle (Maunsbach, Marples et al. 1997). Les ions sodiques sont entrant dans la cellule par transport actif secondaire via l'échangeur sodium-proton (NHE3). La $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase pompe 3 ions de sodium vers le milieu interstitiel en retour de 2 ions K^+ créant ainsi un gradient sodique dans la cellule. Ce gradient chimique stimule le transport couplé du Na^+ ; c'est-à-dire son transport avec d'autres molécules telles que le glucose via des cotransporteurs. Le voltage transépithélial créé par le passage des ions sodiques permet à ces ions de retourner vers la lumière tubulaire via la voie paracellulaire. Ceux-ci continueront dans leur cheminement dans le néphron.

Suite à ce tubule se trouve la branche descendante mince de l'anse de Henlé qui ne réabsorbera que l'eau par osmose grâce aux AQP1. Puisqu'aucun soluté n'est réabsorbé, le filtrat devient hypertonique, produisant ainsi un gradient osmotique. Contrairement à cette dernière portion, la branche ascendante est imperméable à l'eau. La portion large de l'anse de Henlé s'occupe de la réabsorption de 33% du Na^+Cl^- présent initialement dans le filtrat glomérulaire, tandis que la portion mince ne réabsorbe qu'une petite partie, soit environ 3% (Sherwood and Learning 2010). Les ions Na^+ , Cl^- et K^+ quittent la lumière du tubule par transport actif secondaire via le cotransporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ (NKCC2) à la membrane apicale ainsi que par la voie paracellulaire. Les cations de calcium (Ca^{2+}) et de magnésium (Mg^{2+}) sont également réabsorbés par la voie paracellulaire suivant ainsi le voltage transépithélial. À la membrane basolatérale se trouve la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase qui crée une différence de potentiel membranaire, favorisant ainsi l'entrée du sodium du côté apical de la cellule. Grâce à cette réabsorption de sodium, le filtrat devient hypotonique.

Le filtrat hypotonique se dirige ensuite vers le tubule contourné distal (TCD) où il y a réabsorption d'environ 7% du contenu de Na^+Cl^- . Par voie transcellulaire, le Na^+ est réabsorbé via le cotransporteur $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (NCC) ou par NHE2 à la membrane apicale. Comme les autres

segments tubulaires, la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ est présente sur la membrane basolatérale (Brenner and Rector 2008).

La portion ultime du néphron se compose des tubules connecteurs et collecteurs. La réabsorption sodique de ceux-ci se fait principalement par le canal épithélial sodique (ENaC). L'entrée des ions Na^+ favorise l'apparition d'une différence de potentiel entre la lumière tubulaire et le milieu intracellulaire. Ceci favorise la sécrétion d'ions K^+ principalement via le canal potassique de la médulla externe rénale (ROMK) et le transport du Cl^- via les jonctions paracellulaires serrées ou par voie transcellulaire. Ces tubules sont sous l'influence hormonale de l'aldostérone (Pacha, Frindt et al. 1993) qui favorise l'expression membranaire de ENaC et la réabsorption d'ions sodiques ainsi que de la vasopressine (Ecelbarger, Kim et al. 2000). Ces hormones assurent alors une homéostasie sodique adéquate.

1.3.4. Rétroaction tubuloglomérulaire

L'idée de la boucle rétroactive tubuloglomérulaire a vu le jour dans les années 1930 par le chercheur Norbert Goormaghtigh (Eknoyan, Rubens et al. 2009). Son travail a clarifié le rôle de l'appareil juxta-glomérulaire dans la régulation de la pression sanguine par les artérioles afférentes. Les cellules de la macula densa sont capables de détecter la concentration d'ions sodiques dans les cellules du tubule distal par leur entrée via le NKCC2 et NHE2. Cette concentration mène à la transmission du signal pour que divers médiateurs puissent modifier le TFG. Lorsqu'une variation sodique est ressentie, des molécules vasoactives, telles que l'adénosine (Brown, Ollerstam et al. 2001), l'Ang II (Welch and Wilcox 1990, Schnermann, Traynor et al. 1997), la prostaglandine E2 (PGE2) (Peti-Peterdi, Komlosi et al. 2003), l'ANP (Huang and Cogan 1987) et le NO (Liu, Pittner et al. 2002), sont relâchées afin de modifier la résistance de l'artériole afférente.

1.3.5. Altération rénale lors de la RCIU

Les travaux de recherche sur les altérations rénales au cours de la RCIU suggèrent des modifications tant dans l'expression génique de protéines impliquées dans la néphrogénèse

que dans la morphologie cellulaire (Menendez-Castro, Hilgers et al. 2012) augmentant le risque de maladies rénales. De plus, la RCIU prédispose la progéniture à des maladies rénales à l'âge adulte. En 1988, le chercheur Barry Brenner a émis l'hypothèse qu'une diminution de la surface de filtration rénale à la naissance mène au développement de l'hypertension dans la vie postnatale (Brenner, Garcia et al. 1988). Depuis, plusieurs études sur les animaux confirment que la RCIU diminue le nombre de glomérules ou de néphrons (Bassan, Trejo et al. 2000, Bauer, Walter et al. 2000, Buffat, Boubred et al. 2007). Cette observation a également été rapportée chez le mouton sans qu'il y ait altération du SRAA (Zohdi, Moritz et al. 2007). Dans le modèle de RCIU que nous utilisons, l'augmentation de la concentration de créatinine et d'urée dans le plasma sanguin suggère qu'il y a une dysfonction rénale. Par contre, le nombre de glomérules et leur volume sont similaires entre les groupes témoins et RCIU (Battista, Oligny et al. 2002). Dans l'étude, le sexe biologique des fœtus n'a pas été considéré. Tel que décrit à la section 1.5, le sexe peut avoir une influence sur les modifications rénales observées lors d'une RCIU.

Des changements moléculaires et cellulaires ont été identifiés dans les reins de modèles expérimentaux de RCIU. La méthylation du gène p53 est diminuée, augmentant ainsi l'expression de son ARNm et l'induction de l'apoptose rénale en stimulant la transcription de Bax. Conséquemment, le ratio Bax/Bcl-2 est augmenté chez le rat (Pham, MacLennan et al. 2003); mécanisme pouvant mener au déficit néphrotique. Dans une autre étude, le promoteur du gène 11 β -hydroxystéroïde deshydrogénase (type 2) (11 β HSD2) est lié davantage par des répresseurs de transcription que par les activateurs chez les rats nés RCIU (Baserga, Kaur et al. 2010). Comme cet enzyme protège le récepteur des minéralocorticoïdes (MR) d'une stimulation excessive par le cortisol, la protection sera moindre chez ces animaux RCIU favorisant ainsi l'activité du MR. De plus, l'expression de plusieurs gènes de la voie de signalisation de coagulation chez le rat est induite par la RCIU. Ceci pourrait expliquer l'incidence des dysfonctions thrombo-endothéliales et rénales dans des cas de RCIU humaines (Buffat, Boubred et al. 2007). Quelques protéines essentielles pour le développement rénal et la protection contre l'hypoxie ou le stress osmotique sont exprimées différemment dans un modèle de RCIU chez le lapin (Figuroa, Lozano et al. 2012). Enfin, plusieurs protéines impliquées dans les voies de signalisation du métabolisme énergétique, de la prolifération

cellulaire et de l'apoptose sont influencées par la RCIU (Shen, Xu et al. 2010). Tous ces travaux suggèrent donc qu'un environnement fœtal défavorable induit des changements rénaux pouvant avoir de lourdes conséquences après la naissance.

1.4. Système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA)

Le système rénine-angiotensine-aldostérone joue un rôle important dans la régulation de la pression artérielle et de la réabsorption sodique. De plus, lors du stade fœtal, un SRAA équilibré est nécessaire au développement rénal (Guron and Friberg 2000) et au maintien du liquide amniotique en produisant un volume urinaire adéquat. Le SRAA est constitué d'une cascade de molécules et enzymes de divers organes (Fig. 7). L'angiotensinogène, synthétisé dans le foie, circule dans le sang. La rénine, enzyme synthétisée par le rein dans les cellules

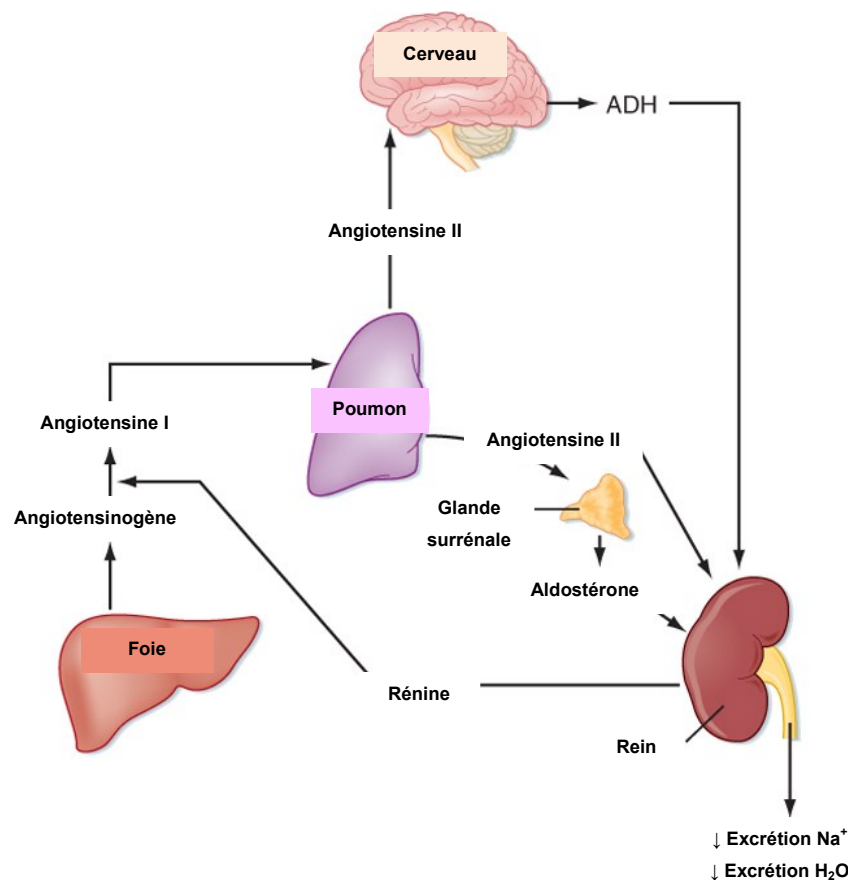


Figure 7. Système rénine-angiotensine-aldostérone. ADH : Hormone antidiurétique – *Antidiuretic hormone* (Adapté de Berne, Levy et al. 2008)

juxtaglomérulaires, convertit l'angiotensinogène en angiotensine I (Ang I). L'enzyme de conversion d'angiotensine (ACE) provenant des poumons convertit, à son tour, l'Ang I en angiotensine II (Ang II). Ce dernier est responsable des réponses physiologiques, telles que la vasoconstriction, ou pathologiques, telles que l'hypertrophie cardiaque. L'angiotensine II ira agir au niveau du cortex surrénal en se liant au récepteur de l'angiotensine II de type I (AT₁R) pour stimuler la synthèse de l'aldostérone. Chez le rat, il existe deux types de ce récepteur à l'Ang II, soit AT₁A et AT₁B (Chiu, Herblin et al. 1989, Iwai and Inagami 1992). Le récepteur de l'Ang II de type II (AT₂R) est aussi présent dans le rein et possède des fonctions opposées à AT₁R, stimulant l'excrétion de sodium et la vasodilatation (Carey and Padia 2008). Finalement, l'aldostérone agira au niveau du rein afin de stimuler la réabsorption de sodium. L'aldostérone peut aussi être impliquée dans la voie de signalisation cardiaque favorisant l'hypertrophie et la fibrose (Qin, Rudolph et al. 2003).

1.4.1. Aldostérone

L'aldostérone est une hormone stéroïdienne isolée en 1953 et dont la structure a été élucidée en 1954 par les chercheurs Sylvia A. Simpson et James F. Tait (Williams 2003). La sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénales peut être stimulée entre autres par l'Ang II (Mulrow and Ganong 1961), l'augmentation de la concentration circulante en ions potassiques (Cannon, Ames et al. 1966, Boyd, Palmore et al. 1971) ou la diminution de la concentration circulante d'ions sodiques via l'osmolalité du plasma sanguin (Schneider, Radke et al. 1985). Cette hormone peut agir soit par voie génomique, soit par voie non-génomique (sans transcription génique). La voie génomique de la rétention sodique sera abordée dans la prochaine section. D'abord, la voie non-génomique est composée de plusieurs cascades dans lesquelles l'aldostérone transactive le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) (McEneaney, Harvey et al. 2007). L'importance de cette signalisation est soulignée dans une étude où l'activation du EGFR peut mener à des pathologies cardiaques (De Giusti, Nolly et al. 2011). Les effecteurs sont nombreux et incluent la MAPK, la protéine kinase C (PKC), la protéine kinase D (PKD) et des seconds messagers comme le Ca²⁺ (Dooley, Harvey et al. 2012).

1.4.1.1. Rôle dans la réabsorption sodique

L'aldostérone sécrétée par les glandes surrénales agira au niveau du néphron distal sensible à l'aldostérone pour stimuler la réabsorption de sodium. Cette hormone se lie au MR, récepteur nucléaire, se trouvant dans le cytosol des cellules tubulaires rénales. Ce dernier est habituellement lié à une protéine de choc thermique (HSP). L'enzyme 11 β HSD2 confère la spécificité au récepteur en convertissant le cortisol (actif) en cortisone (inactif); mécanisme protégeant le récepteur d'une activation excessive (Edwards, Stewart et al. 1988). Il y a alors dimérisation et le complexe récepteur-ligand se dirige vers le noyau où il se lie aux éléments de réponse aux hormones (HRE) présents dans le promoteur des gènes cibles. Il y a alors recrutement de l'ARN polymérase pour synthétiser l'ARNm de l'ADN. Parmi les gènes transcrits et actifs dans la voie de réabsorption sodique se trouvent *Sgk1* [SGK1] (Naray-Fejes-Toth and Fejes-Toth 2000), *Scnn1a* [α -ENaC] (Ono, Kusano et al. 1997), *Tsc22d3* [GILZ] (Robert-Nicoud, Flahaut et al. 2001, Soundararajan, Zhang et al. 2005), *Cnksr3* [CNKSR3] (Ziera, Irlbacher et al. 2009), *Atp1a1* [Na^+ - K^+ -ATPase α_1] (Geering, Girardet et al. 1982) et *Atp1b1* [Na^+ - K^+ -ATPase β_1] (Verrey, Kraehenbuhl et al. 1989).

D'abord, SGK1 est une kinase devant être activée par phosphorylation pour pouvoir exercer son rôle. Ainsi, SGK1 est phosphorylée sur le résidu serine 422 au C-terminal par PDK2, puis sur le résidu thréonine 256 dans la boucle d'activation par PDK1, rendant ainsi la kinase active (Kobayashi and Cohen 1999, Park, Leong et al. 1999). D'autres sites pouvant être phosphorylés ont également été trouvés et augmentent l'activité de la kinase (Chen, Chen et al. 2009). Lorsqu'activée, SGK1 phosphoryle Nedd4-2, une ubiquitine ligase E3 qui interagit avec ENaC (Snyder, Olson et al. 2002) via les motifs PY (Lu, Pribanic et al. 2007) et avec le cotransporteur sodium/chlore (NCC) (Arroyo, Lagnaz et al. 2011). Lorsque ces transporteurs sont phosphorylés, ils sont subséquemment ubiquitinylés et dégradés par le protéasome (Zhou, Patel et al. 2007) (Fig. 8). De plus, SGK1 permet la transcription génique de *Scnn1a* en phosphorylant *ALL1-fused gene from chromosome 9* (Af9) du complexe inhibiteur Dot1a (*disruptor of telomeric silencing alternative splice variant a*)-Af9, stimulant ainsi l'expression génique du canal (Zhang, Xia et al. 2007).

Ensuite, la découverte de l'implication des protéines GILZ (Glissière à leucine induite par les glucocorticoïdes - *Glucocorticoid-induced leucine zipper*) et CNKSR3 (Connecteur activateur de la kinase suppresseur de Ras, isoforme 3 – *Connector enhancer of kinase suppressor of Ras, isoform 3*) dans la voie de réabsorption sodique rénale est récente; leurs rôles respectifs sont alors à clarifier davantage. La voie de signalisation Raf/MEK/ERK inhibe ENaC par sa phosphorylation aux sous-unités β et γ (Shi, Asher et al. 2002). Dans les lymphocytes T, cette voie de protéine-kinases est inhibée par GILZ (Ayroldi, Zollo et al. 2002); postulant ainsi un rôle de GILZ dans la stimulation indirecte du canal sodique en interférant avec cette voie inhibitrice (Fig. 8). De plus, GILZ stabilise la localisation de SGK1 dans le cytoplasme en inhibant son ubiquitinylation (Soundararajan, Wang et al. 2010). D'autre part, l'expression de CNKSR3 corrèle avec le transport sodique épithélial (Ziera, Irlbacher et al. 2009). Sa fonction de protéine d'échafaudage a été prouvée par son interaction avec SGK1, Nedd4-2 et ENaC via son domaine PDZ (PSD-95/DLG-1/ZO-1) ainsi que sa similitude avec d'autres protéines d'échafaudage (Soundararajan, Ziera et al. 2012).

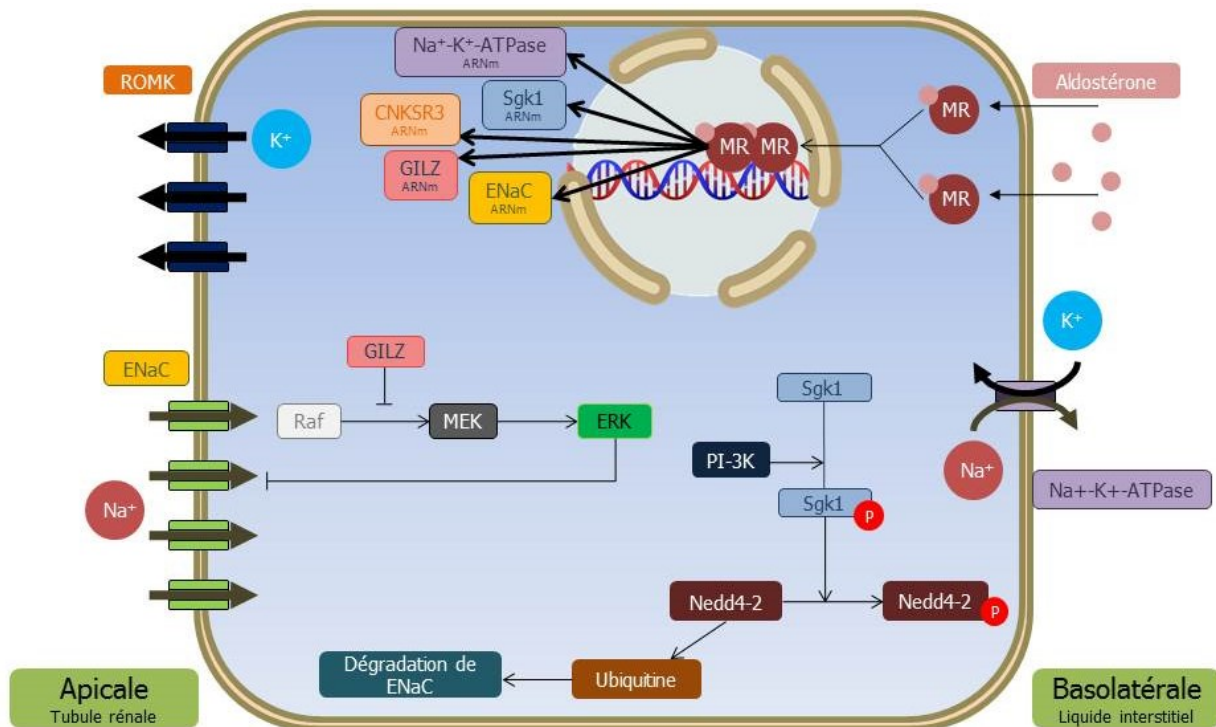


Figure 8. Signalisation rénale intracellulaire. PI-3K : *phosphoinositide 3-kinase*

(Adapté de Houde 2008)

Puis, l'expression d'ENaC est modulée par un complexe régulateur membranaire (ERC) comportant plusieurs protéines (Fig. 9). Lorsqu'il y a stimulation par l'aldostérone, diverses protéines dont SGK1, CNKSR3, GILZ, Raf-1 et Nedd4-2 interagiront physiquement avec ENaC pour augmenter son expression à la membrane et conséquemment le transport sodique. L'effet inhibiteur de Raf-1 et Nedd4-2 ne sera plus présent dans ce complexe. À l'état basal où la stimulation hormonale est absente, seulement les protéines inhibitrices Raf-1 et Nedd4-2 sont liées au canal (Soundararajan, Melters et al. 2009, Soundararajan, Pearce et al. 2012, Soundararajan, Ziera et al. 2012).

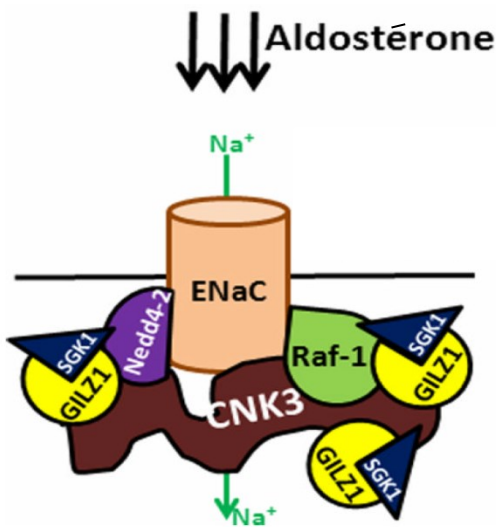


Figure 9. Schématisation du complexe régulateur d'ENaC en présence d'aldostérone (Adapté de Soundararajan, Pearce et al. 2012).

Par ces cascades de signalisation, l'aldostérone augmente la présence du canal à la membrane et stimule sa fonction. Comme ce canal est trouvé dans l'ASDN, portion tubulaire responsable de la fine régulation de sodium, ces voies de signalisation sont primordiales à l'homéostasie sodique systémique.

1.5. Influence du sexe biologique

Plusieurs études démontrent un lien entre le sexe biologique et le développement de maladies; notamment que les hommes sont plus à risque de rencontrer certains problèmes cardiaques et rénaux que les femmes (Neugarten, Acharya et al. 2000). À cet égard, il est important de tenir compte du sexe biologique dans l'étude de la RCIU sur le rein fœtal.

Dans un modèle de RCIU induite par ligature des artères utérines, les rates adultes ont un niveau de VEGF augmenté de plus de quatre fois tandis que les mâles ont un plus haut taux d'aldostérone et souffrent de protéinurie. De plus, les structures glomérulaires montrent des différences indiquant que le sexe biologique influence le développement de maladies rénales ou d'hypertension (Baserga, Bares et al. 2009). Ce même groupe de chercheurs confirment qu'au niveau de l'ADN, les facteurs de transcription du gène du 11 β HSD2 ne sont pas les mêmes chez les mâles et les femelles, et que la méthylation de l'ADN est également différente (Baserga, Kaur et al. 2010). Plus spécifiquement, les mâles RCIU présentent une diminution des activateurs du gène alors que les femelles RCIU ont une augmentation des répresseurs agissant sur ce même gène. Le sexe joue donc un rôle primordial, non seulement au niveau physiologique, mais aux niveaux moléculaire et transcriptionnel.

Une étude montre que les rats mâles ont une croissance rénale plus rapide que les femelles après une néphrectomie et ont des dommages glomérulaires et tubulaires possiblement associés à la testostérone (Mulroney, Woda et al. 1999). De plus, il a été observé que la 17 β -estradiol (E2) diminue la quantité protéique de AT₁R et subséquemment la sécrétion d'aldostérone lorsqu'administrée à des rates ovariectomisées (Wu, Maric et al. 2003). Ceci confère un rôle de protection à l'estradiol qui pourrait alors réduire les risques de maladies cardiovasculaires. Dans une situation d'ischémie rénale, les rats mâles présentent une augmentation de SGK1 comparativement aux femelles. Lors de la castration, cette augmentation n'est plus observée; suggérant que la testostérone est impliquée dans les voies de signalisation suite à un dommage rénal (Rusai, Prokai et al. 2011). Le rôle des hormones sexuelles est alors non-négligeable dans l'apparition de problèmes rénaux.

1.6. Hypothèse et objectifs de travail

Étant donné la forte association entre l'environnement fœtal défavorable et les changements au niveau du rein, l'effet de l'aldostérone sur la rétention sodique ainsi que les dimorphismes sexuels rapportés dans la littérature et dans le modèle que nous utilisons, nous émettons l'hypothèse que la hausse d'aldostérone observée chez les fœtus RCIU entraîne une augmentation de la signalisation rénale par le récepteur des minéralocorticoïdes (MR) et que

l'expression est différente entre les fœtus mâles et femelles. Cette voie est responsable de l'activation des gènes et protéines pour la réabsorption sodique rénale. Les objectifs de ce projet sont de mesurer l'expression génique et protéique de MR, SGK1, pSGK1(Thr 256), α -ENaC, CNKSR3 et GILZ. Les résultats acquis durant ce projet nous aideront à mieux comprendre l'effet de l'aldostérone sur le rein fœtal dans une situation de restriction de croissance intrautérine.

2. Article

Les résultats de ce projet sont présentés sous forme d'article. Celui-ci est intitulé « *Aldosterone signalling in a rat model of intrauterine growth restriction* » et sera soumis au journal *American Journal of Physiology*. Les expériences de RT-PCR et les immunobuvardages de type Western de tous les gènes et protéines (à l'exception de la Na⁺-K⁺-ATPase) ont été réalisés par Ève Mailhot-Daye. Elle a mené le projet de recherche, rédigé la première version de ce manuscrit et élaboré les figures et tableaux présentés. Les expériences impliquant la Na⁺-K⁺-ATPase ont été faites par Marie-Ève Gagnon. Benoit Sicotte a fourni une aide technique lors des expériences et analyses ainsi que des commentaires pertinents sur le manuscrit. L'élaboration du projet de recherche et la conception du manuscrit ont été réalisées par la directrice de recherche, Michèle Brochu.

Par la suite, quelques résultats supplémentaires seront montrés. Ces derniers étaient en complément des résultats du manuscrit, mais se sont avérés négatifs.

2.1 Résumé de l'article en français

La restriction de croissance intrautérine (RCIU) peut être une conséquence d'un environnement utérin défavorable pouvant prédisposer des individus au développement de maladies cardiovasculaires, de dysfonction rénale ou de l'hypertension à l'âge adulte. Ces pathologies mettent les hommes plus à risque de mortalité ou de morbidité que les femmes, classifiant le sexe biologique comme facteur important. Le laboratoire d'accueil a développé un modèle animal de RCIU en administrant une diète faible en sodium aux rates gestantes durant la dernière semaine de gestation, diminuant ainsi l'expansion volémique maternelle et la perfusion utéroplacentaire. Des modifications du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) telles qu'une augmentation de l'activité rénine et la concentration d'aldostérone plasmatique sont observées. À l'âge de 12 semaines, les rats nés RCIU montrent des signes de dysfonction rénale et développent de l'hypertension. Suite à ces observations, nous émettons l'hypothèse que la hausse du taux d'aldostérone chez les fœtus RCIU entraîne une augmentation et une expression différentielle, selon le sexe, des éléments de la cascade de signalisation rénale du récepteur des minéralocorticoïdes (MR). L'objectif de cette étude est de mesurer l'expression génique et protéique des éléments de la cascade de signalisation du MR dans les reins fœtaux. L'expression génique de SGK, α -ENaC, GILZ, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha_1$ and β_1 est augmentée alors que celle de CNKSR3 et MR est inchangée. Les résultats démontrent une diminution de l'expression protéique du MR et aucun changement pour les protéines SGK, pSGK1(Thr 256), α -ENaC et CNKSR3. Seule la protéine $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase-}\alpha_1$ est augmentée chez les RCIU et exprimée différemment entre mâles et femelles. Ces résultats indiquent que l'expression génique de la cascade de signalisation du MR dans les reins de

fœtus RCIU est augmentée et ceci pourrait prédisposer au développement de maladies à l'âge adulte.

MOTS-CLÉS

Programmation fœtale, plasticité développementale, minéralocorticoïde, rein, sodium.

2.2 Manuscrit

TITLE PAGE

Aldosterone signalling in a rat model of intrauterine growth restriction

Ève Mailhot-Daye, Marie-Ève Gagnon, Benoit Sicotte and Michèle Brochu

Department of Physiology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title: MR signalling in IUGR

Corresponding author:

Dr. Michèle Brochu

Département de physiologie

Université de Montréal

C.P. 6128 Succursale Centre-Ville

Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Telephone: 514-343-6347, Extension 3345 or 38523

Fax: 514-343-2111

Email address:

ABSTRACT

Intrauterine growth restriction (IUGR) can be a consequence of an unfavourable uterine environment and it can predispose individuals to the development of cardiovascular disease, kidney failure or hypertension in adulthood. These pathologies place men at greater risk of morbidity and mortality than women, making sex an important factor. We have developed a rat model of IUGR by administering a low-sodium diet to pregnant dams during the last week of gestation. This model is characterized by decreased plasma volume expansion and uteroplacental perfusion. Modifications of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) such as increased plasma renin activity (PRA) and plasma aldosterone are observed. At 12 weeks, IUGR offspring show signs of renal dysfunction and develop hypertension. Based on these observations, we hypothesized that the increase in aldosterone levels in IUGR fetuses will alter the renal sodium reabsorption pathway and that foetal sex will affect the outcome. Our objective was to quantify gene and protein expression in foetal kidneys of several components reported to be implicated in the sodium reabsorption pathway and regulated by aldosterone. Gene expression for SGK1, α -ENaC, GILZ, Na^+ - K^+ -ATPase α_1 and β_1 were all increased in IUGR foetal kidneys, while CNKSR3 and mineralocorticoid receptor (MR) expressions were unchanged. Our results report a decrease in MR protein levels and no apparent change in protein levels for SGK1, pSGK1(Thr 256), α -ENaC and CNKSR3. Only the Na^+ - K^+ -ATPase- α_1 subunit was increased and its gene was expressed differently between males and females. These results indicate that in IUGR fetuses there is differential gene expression within the sodium reabsorption pathway and that this may predispose them to the development of adulthood disease. No change in protein levels was detected.

KEYWORDS

Foetal programming, developmental plasticity, mineralocorticoid, kidney, sodium

INTRODUCTION

Many studies have previously shown that an inadequate foetal environment may have long term effects on the offspring that can lead to cardiovascular disease, obesity and metabolic disorders (1, 3, 5, 10, 46). In some cases, this inadequate environment may lead to intrauterine growth restriction (IUGR) which is defined as having a birth weight lower than the 10th percentile for a given gestational age. In humans, IUGR can be idiopathic or be a consequence of poor maternal or foetal health, nutrition and environment. Its incidence in developed countries is between 5-10% (28, 34) and is reported to be higher in developing countries (13). Studies show that IUGR rats have increased arterial pressure beginning from 4 weeks of age to adulthood (1) and differential gene expression of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) with decreased methylation of the AT_{1b} angiotensin receptor (10); both situations predisposing them to hypertension. In a single study, two models of rat IUGR were developed and each led to different outcomes in insulin responsiveness (46). Increased adiposity and modified feeding habits have been confirmed in IUGR lamb (12) leading to higher risk of obesity. Low nephron or glomeruli number in the kidney from birth to adulthood (25, 43), differential gene expression in the renal coagulation cascade (11) and proteins from pathways involved in energy metabolism, redox reactions, signal transduction, cell proliferation and apoptosis during nephrogenesis (45) are also consequences of IUGR. Moreover, the effects of IUGR could be different depending on the sex of the animal. In adult rats who suffered from IUGR, oxidative stress markers in the kidney were present in males only while females expressed higher levels of antioxidants (36) confirming that sex influences molecular changes and subsequent phenotype. The estimated glomerular filtration rate was decreased in IUGR adult males and proteinuria was higher in females (44). Furthermore, sex hormones, such as

testosterone, were implicated in protein expression in renal ischemia-reperfusion injury (40). Additionally, oestrogen supplementation improves cardiac contractility after ischemia (26) and normalizes blood pressure (35) in ovariectomized rats. Therefore, it is crucial to understand the differences between males and females to fully develop preventative care and treatments applicable to each sex.

We have developed a model of IUGR in the rat by administering a low-sodium diet to pregnant dams during the last week of gestation (39). This model is characterized by a reduced maternal volume expansion leading to diminished placental perfusion as seen in women with preeclampsia or foetal growth restriction (41). Privileged blood flow to the foetal brain and heart instead of the kidney were observed in IUGR fetuses (5). At 22 days of age, the IUGR fetuses have increased levels of plasma aldosterone with reduced levels of plasma sodium (9). As adults (12 weeks), the IUGR offspring have high plasma concentrations of urea and creatinine suggesting decreased glomerular filtration and a modification of the renin-angiotensin-aldosterone system exhibited by increased plasma renin activity. They also excrete less sodium and show signs of renal dysfunction (5). Sodium reabsorption is a tightly regulated phenomenon occurring mainly in the kidney and many proteins have been shown to be regulated by aldosterone to control sodium transport (20, 30, 33, 52). Hence, we aim to determine if there are molecular or cellular modifications *in utero* that could lead to the observations seen in adulthood. We hypothesize that the gene and protein expression of several components from the renal sodium reabsorption pathway will be increased in kidneys of IUGR fetuses and differentially expressed between males and females. To verify our hypothesis, we quantified gene and protein expression of MR (*Nr3c2*) (mineralocorticoid receptor), SGK1 (*Sgk1*) (serum-and-glucocorticoid induced kinase, isoform1) and its

phosphorylated form (pSGK1 (Thr256)), α -ENaC (*Scnn1a*) (alpha subunit of the epithelial sodium channel), CNKSR3 (*Cnksr3*) (connector enhancer of kinase suppressor of Ras, isoform 3), GILZ (*Tsc22d3*) (Glucocorticoid-induced leucine zipper), Na⁺-K⁺-ATPase α_1 (*Atp1a1*) and β_1 (*Atp1b1*) (sodium potassium ATPase, alpha and beta subunits) in kidneys of control and IUGR male and female foetuses.

MATERIALS AND METHODS

Animal protocol and tissue preparation

The institutional Animal Care Committee, accredited by the Canadian Council on Animal Care has approved this study. Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Quebec, Canada) weighing between 225 and 250 g were mated with a fertile male. The presence of spermatozoa in morning vaginal smears determines Day 1 of pregnancy. All animals were kept in a room with controlled lighting (6 AM-6 PM) and temperature (22 \pm 2°C). Dams were randomly assigned 1 of 2 diets from Day 15 to Day 22 of gestation (term = Day 23). The control group was given a normal diet containing 0.20% sodium and 0.40% potassium (normal diet 5755; PMI Feed Inc., Ren's Feed and Supplies, Oakville, Ontario, Canada) and tap water. To induce IUGR, the experimental group was given a low-sodium diet containing 0.03% sodium and 0.85% potassium (low-sodium diet 5881; PMI Feed Inc.) and demineralized water as previously shown (5, 6, 9, 39). Both diets had similar compositions of protein (19%), carbohydrate (60.6%) and fat (10%). On day 22 of gestation, the dams were anesthetised with isoflurane and sacrificed by decapitation (9AM – 9:30AM). The uteri were removed and dissected to access the foetuses. The foetuses were then separated by sex which was determined by the distance between anal and genital openings; males having a greater

distance than females. Each foetus was decapitated and the kidneys were removed and placed in a saline solution (0.9% NaCl). Kidneys were then snap-frozen and stored at -80°C or kept fresh for tissue preparation. For clarification, n = 1 represented sex-pooled kidneys from 1 litter for each group and is referenced as such throughout this study.

*RNA isolation and RT-PCR for Na⁺-K⁺-ATPase subunits (*Atp1a1* and *Atp1b1*)*

Total RNA was extracted from three whole kidneys of fetuses with TRIzol reagent (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada). RNA concentration was determined by absorbance measurement at a wavelength of 260 nm while integrity of the samples was established by the 260/280 nm ratio (NanoDrop 2000c). The quality of the sample was verified by electrophoresis on 1% agarose gel and visualization by ethidium bromide fluorescence with Alpha Imager (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, California, USA). Primers for *Atp1a1*, *Atp1b1* and *Gapdh* were designed by PRIMER3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi), using sequence data from the national center for biotechnology information (NCBI) database (Table 1). Single-stranded cDNA was created by reverse transcription (SuperScriptTM II RNase H- Reverse Transcriptase, Invitrogen Canada Inc.) from extracted RNA. PCR (Taq DNA Polymerase, Invitrogen Canada Inc.) was performed according to manufacturer's procedure. The annealing step was carried out for 1 min at temperatures previously determined (*Atp1a1*, 55°C; *Atp1b1*, 58°C; *Gapdh*, 56°C). The extension step was performed at 72°C for 1 min. The optimal cycle number was also established (22 for *Gapdh* and *Atp1b1*, 25 for *Atp1a1*). The PCR products for these 3 genes were electrophoresed on 1% agarose gels with further coloration by a solution containing 0.02% ethidium bromide. Amplification products were quantified by Alpha Imager

(Alpha Innotech Corporation, San Leandro, California USA) using *Gapdh* as internal control with n = 6/group.

RNA isolation RT-PCR for Nr3c2, Sgk1, Scnn1a, Cnksr3 and Tsc22d3

Total RNA from one foetal kidney per litter was extracted and purified using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) and kept at -20°C. RNA concentration, integrity and quality were conducted similarly as Na⁺-K⁺-ATPase protocol. Primers specific for the genes of interest (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2 known as the mineralocorticoid receptor [*Nr3c2*], serum-and glucocorticoid-induced kinase, isoform 1 [*Sgk1*], sodium channel, non-voltage-gated 1 alpha subunit known as the epithelial sodium channel, alpha subunit [*Scnn1a*], TSC22 domain family, member 3 [*Tsc22d3*] known as GILZ and connector enhancer of kinase suppressor of Ras, isoform 3 [*Cnksr3*]) were obtained from Qiagen (Mississauga, Ontario, Canada) (Table 2) and were resuspended in TE Buffer, pH 8.0 (10 mM Tris, 1 mM EDTA). A two-step quantitative RT-PCR protocol was done following the manufacturer's procedure. Single-strand cDNA was created by reverse transcription from total RNA samples (0.75 µg) using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) and Biometra TGradient Thermocycler (Montreal Biotech, Inc. Kirkland, Quebec, Canada). The cDNA samples were stored at -20°C. Quantitative PCR was performed using the QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) with the DNA Engine Opticon 2 apparatus and Opticon Monitor software (50°C for 2 min, 95°C for 15 min, 94°C for 15 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 30 sec) for 45 cycles. Each reaction consisted of 2.5 µL of cDNA, 0.5 µL (0.5 units) of uracil-DNA-glycosylase (UDG) (Qiagen), 12.5 µL 2x QT SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 2.5 µL 10x QT Primer

Assay (Qiagen) and 7.0 μ L of RNase-free water. UDG was used to eliminate carry over contamination. The procedure was conducted with triplicate samples. The results were reported on expression of ribosomal protein, large P0 [*Rplp0*] as internal control.

Protein expression

MR, SGK1, pSGK1(Thr256), α -ENaC, CNKSR3, GILZ, Na⁺-K⁺-ATPase α_1 and β_1 protein expressions were determined by Western blot. Only Na⁺-K⁺-ATPase localized on cell membranes can pump Na⁺ and K⁺ efficiently, thus membrane fractions were isolated as described by Kang et al. (23). Briefly, whole kidneys from foetuses (n = 12/group) were homogenized in sucrose buffer (pH 7.6) and centrifuged (α_1 , 1,000 g x 5 min and 10,000 g x 10 min; β_1 , 2,500 g x 15 min). Supernatants were collected and ultracentrifuged at 300,000 g x 1 h. The pellets were resuspended in sample buffer. For all other proteins, total cell lysates were obtained; fresh (for MR) or frozen foetal kidneys (n = 5/group) were homogenized in fresh lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate and 1X complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet (Roche, Indianapolis, Indiana, USA) and centrifuged at 12,000 g for 30 min at 4°C. Supernatants were collected and resuspended in sample buffer. Protein concentrations were quantified with the BioRad Assay kit (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada), and BSA served as a standard. Exact conditions are described in Table 3. Briefly, proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred electrophoretically onto nitrocellulose membranes (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). Non-specific sites on membranes were blocked in 5% non-fat milk or 5% BSA in phosphate-buffered saline (PBS: 1.4 M NaCl, 2.7 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 17.6

mM KH_2PO_4 , pH 7.4)/0.1% Tween-20. For MR, membranes were blocked in 1% non-fat milk in Tris buffer (50 mM Tris, pH 7.3)/0.05% Tween-20, as described elsewhere (21). For Na^+ - K^+ -ATPase subunits, membranes were blocked in 5% non-fat milk in tris-buffered saline (TBS)/0.1% Tween-20. Overnight incubation at 4°C was conducted with appropriate primary antibodies. All membranes were washed with PBS/0.1% Tween-20, except for MR membrane which was washed with PBS 1X. The membranes were incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody: donkey anti-rabbit or sheep anti-mouse IgG (1:5000; Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) or donkey anti-goat IgG (1:5,000; Santa Cruz Biotechnology Inc.) for 45 min at room temperature. Equal protein loading was determined on the same membrane by stripping with a solution containing 0.2 M glycine and 0.05% Tween-20 (pH 2.5), washing and then reprobing with mouse anti- β -actin primary antibody (1:100,000; Sigma-Aldrich Canada Co., Oakville, Ontario, Canada) for 1 h at room temperature and with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody. Immunoreactive bands were visualized with the ECL Western blotting analysis system (GE HealthCare Biosciences Inc., Montreal, Quebec, Canada) on Hyperfilm ECL (GE HealthCare Biosciences Inc., Montreal, Quebec, Canada) and quantified by Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation) or ImageJ (National Institutes of Health). Results were expressed as densitometric units relative to β -actin.

Statistical analyses

Results were expressed as mean \pm SEM. The effect of IUGR and sex were compared by two-factor ANOVA followed by Bonferroni correction as post-hoc analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 4.03 for Windows (GraphPad

Software, San Diego, California, USA). Statistical significance was assumed with a value of $P < 0.05$.

RESULTS

Effect of IUGR on gene and protein expression of components in the sodium reabsorption pathway

To determine if there is a difference in gene expression of components from this pathway, qRT-PCR was done for *Nr3c2*, *Sgk1*, *Scnn1a*, *Cnksr3*, *Tsc22d3*, *Atp1a1* and *Atp1b1*. As shown in figure 1A, *Nr3c2* (MR) mRNA expression was not different between IUGR and control groups, regardless of sex. Protein expression of MR was decreased in IUGR groups compared to controls ($P < 0.05$, two-factor ANOVA; controls vs. sex-matched IUGR: males, 1.1 ± 0.1 vs. 0.5 ± 0.1 ; females, 1.5 ± 0.3 vs. 0.9 ± 0.2) (Figure 1B).

Gene expression of *Sgk1* was increased in foetal IUGR kidneys compared to controls ($P < 0.0001$, two-factor ANOVA; controls vs. sex-matched IUGR: males, 0.9 ± 0.1 vs. 1.3 ± 0.1 , $P < 0.05$; females, 0.9 ± 0.1 vs. 1.6 ± 0.1 , $P < 0.001$, Bonferroni post-test) (Figure 2A). We then proceeded to verify if this increased mRNA expression resulted in increased expression of its protein. It did not as expression of SGK1 protein and its phosphorylated form (pSGK(Thr 256)) displayed no difference between control and IUGR groups (Figure 2B & 2C).

The mRNA expression of *Scnn1a* (α -ENaC) was also increased in IUGR groups ($P < 0.0001$, two-factor ANOVA; controls vs. sex-matched IUGR: males, 0.9 ± 0.1 vs. 1.8 ± 0.3 ; females, 0.8 ± 0.0 vs. 1.8 ± 0.3 ; $P < 0.01$ for both sexes, Bonferroni post-test) (Figure 3A). The protein expression of α -ENaC was not different between groups (Figure 3B).

In foetal IUGR kidneys, gene expression of *Cnksr3* was lower, but was not statistically significant ($p = 0.08$) (Figure 4A). CNKSR3 protein expression was not different between control and IUGR kidneys of either sex (Figure 4B).

The GILZ gene (*Tsc22d3*) was increased in male IUGR kidneys ($P < 0.01$, two-factor ANOVA; controls vs. sex-matched IUGR: 0.7 ± 0.0 vs. 1.0 ± 0.1 , $P < 0.05$, Bonferroni post-test) while in females, the increase was not statistically significant (Figure 5).

Both subunits of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ displayed increased mRNA expression; *Atp1a1* was increased in females ($P < 0.01$, two-factor ANOVA; controls vs. sex-matched IUGR: 0.7 ± 0.0 vs. 1.0 ± 0.1 , $P < 0.05$, Bonferroni post-test) and *Atp1b1* was elevated in both sexes ($P < 0.001$, two-factor ANOVA; controls vs. sex-matched IUGR: males, 0.8 ± 0.0 vs. 1.0 ± 0.0 , $P < 0.05$; females, 1.0 ± 0.1 vs. 1.2 ± 0.1 , $P < 0.01$, Bonferroni post-test) (Figures 6A & 7). $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase-}\alpha_1$ protein expression was increased in female foetal IUGR kidneys only ($P < 0.05$, two-factor ANOVA; controls vs. sex-matched IUGR: 0.3 ± 0.0 vs. 0.6 ± 0.1 , $P < 0.05$; Bonferroni post-test) (Figure 6B).

The expression of GILZ and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase-}\beta_1$ protein was not detected (data not shown).

DISCUSSION

We have previously shown that induction of IUGR in rats led to increased plasmatic levels of aldosterone in both dams and their foetuses (9) and that young adult IUGR offspring displayed renal dysfunction (5). These observations led us to believe that the renal sodium reabsorption pathway could be altered *in utero* leading to improper regulation later in life. Our IUGR model is an important tool to study the consequence of a reduced volume expansion on the foetus and the impact it may have in the offspring, as many alterations have been described (4-6, 9).

Pregnancy is normally associated with increased RAAS activity to accommodate the needed volume expansion and blood flow for foetal growth. Aldosterone levels are even more elevated when given a low-sodium diet to induce IUGR (39) and in infants born with low birth weight (16). The global objective of our study was to determine if molecular and cellular modifications in the renal intracellular reabsorption pathway could explain dysfunctions in adulthood. Globally, our results demonstrate that renal mRNA level for the aldosterone receptor (MR) was similar between all groups but its protein level was decreased in IUGR kidneys. Furthermore, our results demonstrate that in kidneys from IUGR fetuses, gene expression of *Sgkl* and *Scnn1a* was increased without inducing changes in their protein levels. Gene and protein of CNKSR3 were not different in IUGR foetal kidneys. Expression of *Tsc22d3* mRNA was increased in male IUGR foetal kidneys while its protein was undetectable. Gene expression of *Atp1a1* and *Atp1b1* was also increased, while α_1 subunit of the Na^+/K^+ -ATPase was elevated at the protein level only in female foetal IUGR kidneys; β_1 protein was undetectable.

The MR mRNA levels similar in all groups is consistent with results stating that aldosterone had no impact on renal MR gene expression of mice at birth (29) and unchanged MR mRNA levels in foetal and neonatal kidneys in a low-protein model of IUGR (8). Protein expression of MR was decreased in foetal kidneys from our IUGR model. Faresse and colleagues indicated that in mCCD_{cl1} cells, aldosterone treatment decreased endogenous MR levels. Their study also suggested that differential ubiquitylation triggered MR degradation and that aldosterone aided this process by phosphorylating the receptor (18). Although, their work was done with cell cultures, it would be interesting to verify if the MR does present post-translational modifications in our IUGR model. Their study does corroborate our results and

indicates that aldosterone does affect protein levels of its receptor by helping its degradation. Additionally, MR protein expression was decreased in human proximal tubule cells after aldosterone treatment, but returned to control levels after 6 h (42). Aldosterone contributes to ENaC expression and membrane localization by various pathways including deubiquitylation via Usp2-45 (17), activation of the SGK1 – Nedd4-2 axis (14) and removal of the Dot1a-Af9 repressor complex located at the *Scnn1a* gene promoter (51).

RT-PCR results indicated that *Sgkl* mRNA is elevated in kidneys from IUGR fetuses, consistent with previous reports in kidneys of mice having received aldosterone infusion (22) or in human colonic cell lines with aldosterone stimulation (7). At the protein level, SGK1 regulates membrane expression of ENaC via its implication in the ENaC-regulatory complex (47). Although its gene expression was elevated, SGK1 was not different in IUGR kidneys. Likewise, total SGK1 protein was unchanged after aldosterone stimulation in human proximal tubule cells (42). A requirement for SGK1 activity is its phosphorylation that occurs at threonine 256 by phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) (24). Therefore, we proceeded to quantify protein expression of pSGK1(Thr256). Foetal IUGR kidneys did not present increased expression of the activated form of SGK1. It was recently revealed that aldosterone treatment on human proximal tubule cells induced maximal SGK1 phosphorylation at 0.5 h. The same study also mentioned that protein levels of pSGK1 returned to control levels after 6 h of treatment (42). We can suppose that when the kidneys are taken at gestational day 22, pSGK1 protein levels are not at their highest. However, it should be noted that their antibodies differ from ours and their results are obtained from pSGK1 to total SGK1 ratio.

Aldosterone also stimulates the mRNA expression (2) and protein expression (30) of α -ENaC, unlike the β and γ subunits which are ubiquitous. In our IUGR model, mRNA expression of

Scnn1a (α -ENaC) was increased in foetal kidneys. Consistent with our results, dietary salt restriction leading to increased levels of aldosterone resulted in higher mRNA levels of α -ENaC in the kidney (31, 37). However, at the protein level, this ENaC subunit was not different between control and IUGR groups. It has been shown that the channel's activity (38) and protein expression (19) reach a peak with a sodium-deficient diet lasting one week that is comparable to our study. In the study by Pacha and colleagues, plasma aldosterone was far superior to levels observed in IUGR fetuses; therefore α -ENaC protein may not be optimally stimulated in our animals. In a model of prenatal programmed hypertension induced by maternal low-protein diet (LP), ENaC subunits were similar between control and experimental groups, although other Na^+ transporters were increased in 4-week old LP offspring (27). They did not report an increase in aldosterone, but proposed that glucocorticoids may be responsible for their results.

Although not much is known about CNKSR3, it has been shown to be an aldosterone-regulated gene (52). In this study, gene expression of *Cnksr3* was not significantly different between the groups ($P = 0.08$). At the protein level, it is involved in the ENaC-regulatory complex (50) as a scaffold protein that associates with other proteins to form the complex. Kidneys from IUGR fetuses CNKSR3 showed no variation and had similar expression to their control counterparts. Results from the literature were obtained with cell lines or microdissected aldosterone-sensitive distal nephron (ASDN) tubules (50, 52) while our study was done using kidney tissue and whole cell lysates. This difference may contribute to dissimilarity between the studies.

It was shown that GILZ is an aldosterone-induced gene and that its protein expression stimulates sodium transport (48, 49). We have shown that IUGR fetuses in which aldosterone

levels are high have increased levels of GILZ mRNA confirming this hormonal control. However, GILZ protein was not detectable. A recent report demonstrated that GILZ is a target of sumoylation in thymocytes (15). Therefore, we immunoprecipitated SUMO1 protein and immunoblotted against GILZ, but its protein was unfortunately not detected. Using kidney tissue instead of cell cultures or thymocytes is probably one reason for this disparity.

Sodium reabsorption is also stimulated by the sodium gradient generated by $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity at the basolateral membrane, one of the limiting factors of aldosterone-stimulated sodium reabsorption (32). Gene expression of this pump is regulated hormonally. In IUGR foetal kidneys, qRT-PCR confirms that subunits α_1 (catalytic subunit) and β_1 (regulatory subunit) of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ are both increased. Additionally, protein expression of the α_1 subunit is also elevated, but this occurs only in female IUGR kidneys. The same subunit was increased in an aldosterone treatment scenario (42). Due to the decrease in sodium plasma levels in IUGR fetuses, we can suppose that the increase in $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ will attempt to restore renal sodium homeostasis.

In the present study, we have reported that gene expression of some elements of the aldosterone signalling pathway is increased in kidneys from IUGR fetuses without increased protein levels suggesting possible post-transcriptional regulation. Moreover protein expression of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ subunits were increased in kidneys from females confirming the importance of studying males and females separately.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Celso E. Gomez-Sanchez from the Division of Endocrinology at the University of Mississippi for his generous donation of MR antibodies. We thank Dr. Daniel Bichet's laboratory (Université de Montréal) for technical support in PCR analysis.

GRANTS

CIHR (Canada)

DISCLOSURES

Nothing to disclose.

REFERENCES

1. **Alexander BT.** Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring. *Hypertension* 41: 457-462, 2003.
2. **Asher C, Wald H, Rossier BC, and Garty H.** Aldosterone-induced increase in the abundance of Na⁺ channel subunits. *Am J Physiol* 271: C605-611, 1996.
3. **Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, and Wadsworth ME.** Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298: 564-567, 1989.
4. **Battista MC, Calvo E, Chorvatova A, Comte B, Corbeil J, and Brochu M.** Intra-uterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats. *J Physiol* 565: 197-205, 2005.
5. **Battista MC, Oligny LL, St-Louis J, and Brochu M.** Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E124-131, 2002.
6. **Bedard S, Sicotte B, St-Louis J, and Brochu M.** Modulation of body fluids and angiotensin II receptors in a rat model of intra-uterine growth restriction. *J Physiol* 562: 937-950, 2005.
7. **Bergann T, Fromm A, Borden SA, Fromm M, and Schulzke JD.** Glucocorticoid receptor is indispensable for physiological responses to aldosterone in epithelial Na⁺ channel induction via the mineralocorticoid receptor in a human colonic cell line. *Eur J Cell Biol* 90: 432-439, 2011.
8. **Bertram C, Trowern AR, Copin N, Jackson AA, and Whorwood CB.** The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology* 142: 2841-2853, 2001.
9. **Bibeau K, Battista MC, Houde V, and Brochu M.** Fetal adrenal gland alterations in a rat model of adverse intrauterine environment. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R899-911, 2010.
10. **Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP, and Clark AJ.** Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circ Res* 100: 520-526, 2007.
11. **Buffat C, Boubred F, Mondon F, Chelbi ST, Feuerstein JM, Lelievre-Pegorier M, Vaiman D, and Simeoni U.** Kidney gene expression analysis in a rat model of intrauterine growth restriction reveals massive alterations of coagulation genes. *Endocrinology* 148: 5549-5557, 2007.
12. **De Blasio MJ, Gatford KL, Robinson JS, and Owens JA.** Placental restriction of fetal growth reduces size at birth and alters postnatal growth, feeding activity, and adiposity in the young lamb. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R875-886, 2007.
13. **de Onis M, Blossner M, and Villar J.** Levels and patterns of intrauterine growth retardation in developing countries. *Eur J Clin Nutr* 52 Suppl 1: S5-15, 1998.
14. **Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, Munster C, Chraibi A, Pratt JH, Horisberger JD, Pearce D, Loffing J, and Staub O.**

Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J* 20: 7052-7059, 2001.

15. **Delfino DV, Spinicelli S, Pozzesi N, Pierangeli S, Velardi E, Bruscoli S, Martelli MP, Pettirossi V, Falchi L, Kang TB, and Riccardi C.** Glucocorticoid-induced activation of caspase-8 protects the glucocorticoid-induced protein Gilz from proteasomal degradation and induces its binding to SUMO-1 in murine thymocytes. *Cell Death Differ* 18: 183-190, 2011.

16. **Doerr HG, Versmold HT, Bidlingmaier F, and Sippell WG.** Adrenocortical steroids in small-for-gestational-age term infants during the early neonatal period. *Pediatr Res* 25: 115-118, 1989.

17. **Fakitsas P, Adam G, Daidie D, van Bemmelen MX, Fouladkou F, Patrignani A, Wagner U, Warth R, Camargo SM, Staub O, and Verrey F.** Early aldosterone-induced gene product regulates the epithelial sodium channel by deubiquitylation. *J Am Soc Nephrol* 18: 1084-1092, 2007.

18. **Faresse N, Vitagliano JJ, and Staub O.** Differential ubiquitylation of the mineralocorticoid receptor is regulated by phosphorylation. *FASEB J* 26: 4373-4382, 2012.

19. **Frindt G and Palmer LG.** Surface expression of sodium channels and transporters in rat kidney: effects of dietary sodium. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F1249-1255, 2009.

20. **Geering K, Girardet M, Bron C, Kraehenbuhl JP, and Rossier BC.** Hormonal regulation of (Na⁺,K⁺)-ATPase biosynthesis in the toad bladder. Effect of aldosterone and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *J Biol Chem* 257: 10338-10343, 1982.

21. **Gomez-Sanchez CE, de Rodriguez AF, Romero DG, Estess J, Warden MP, Gomez-Sanchez MT, and Gomez-Sanchez EP.** Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* 147: 1343-1348, 2006.

22. **Hou J, Speirs HJ, Seckl JR, and Brown RW.** Sgk1 gene expression in kidney and its regulation by aldosterone: spatio-temporal heterogeneity and quantitative analysis. *J Am Soc Nephrol* 13: 1190-1198, 2002.

23. **Kang DG, Oh H, Sohn EJ, Hur TY, Lee KC, Kim KJ, Kim TY, and Lee HS.** Lithospermic acid B isolated from *Salvia miltiorrhiza* ameliorates ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Life Sci* 75: 1801-1816, 2004.

24. **Kobayashi T and Cohen P.** Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J* 339 (Pt 2): 319-328, 1999.

25. **Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Becker LE, Muller A, Weckbach M, Nyengaard JR, Schirmacher P, and Gross-Weissmann ML.** Both high and low maternal salt intake in pregnancy alter kidney development in the offspring. *Am J Physiol Renal Physiol* 301: F344-354, 2011.

26. **Kolodgie FD, Farb A, Litovsky SH, Narula J, Jeffers LA, Lee SJ, and Virmani R.** Myocardial protection of contractile function after global ischemia by physiologic estrogen replacement in the ovariectomized rat. *J Mol Cell Cardiol* 29: 2403-2414, 1997.

27. **Manning J, Beutler K, Knepper MA, and Vehaskari VM.** Upregulation of renal BSC1 and TSC in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F202-206, 2002.

28. **Martin JA, Hamilton, Brady E., Ventura, Stephanie J., Osterman, Michelle J.K., Mathews, T.J.** Births: Final Data for 2011. *Natl Vital Stat Rep* 62, 2013.

29. **Martinerie L, Viengchareun S, Meduri G, Kim HS, Luther JM, and Lombes M.** Aldosterone postnatally, but not at birth, is required for optimal induction of renal mineralocorticoid receptor expression and sodium reabsorption. *Endocrinology* 152: 2483-2491, 2011.
30. **Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, and Knepper MA.** Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 104: R19-23, 1999.
31. **Masilamani S, Wang X, Kim GH, Brooks H, Nielsen J, Nielsen S, Nakamura K, Stokes JB, and Knepper MA.** Time course of renal Na-K-ATPase, NHE3, NKCC2, NCC, and ENaC abundance changes with dietary NaCl restriction. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F648-657, 2002.
32. **Morla L, Crambert G, Mordasini D, Favre G, Doucet A, and Imbert-Teboul M.** Proteinase-activated receptor 2 stimulates Na,K-ATPase and sodium reabsorption in native kidney epithelium. *J Biol Chem* 283: 28020-28028, 2008.
33. **Naray-Fejes-Toth A and Fejes-Toth G.** The sgk, an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells, regulates the epithelial sodium channel. *Kidney Int* 57: 1290-1294, 2000.
34. **OECD.** *Health at a Glance 2011*: OECD Publishing.
35. **Ojeda NB, Grigore D, Robertson EB, and Alexander BT.** Estrogen protects against increased blood pressure in postpubertal female growth restricted offspring. *Hypertension* 50: 679-685, 2007.
36. **Ojeda NB, Hennington BS, Williamson DT, Hill ML, Betson NE, Sartori-Valinotti JC, Reckelhoff JF, Royals TP, and Alexander BT.** Oxidative stress contributes to sex differences in blood pressure in adult growth-restricted offspring. *Hypertension* 60: 114-122, 2012.
37. **Ono S, Kusano E, Muto S, Ando Y, and Asano Y.** A low-Na⁺ diet enhances expression of mRNA for epithelial Na⁺ channel in rat renal inner medulla. *Pflugers Arch* 434: 756-763, 1997.
38. **Pacha J, Frindt G, Antonian L, Silver RB, and Palmer LG.** Regulation of Na channels of the rat cortical collecting tubule by aldosterone. *J Gen Physiol* 102: 25-42, 1993.
39. **Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, and Brochu M.** Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *American journal of obstetrics and gynecology* 180: 608-613, 1999.
40. **Rusai K, Prokai A, Szebeni B, Meszaros K, Fekete A, Szalay B, Vannay A, Degrell P, Muller V, Tulassay T, and Szabo AJ.** Gender differences in serum and glucocorticoid regulated kinase-1 (SGK-1) expression during renal ischemia/reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem* 27: 727-738, 2011.
41. **Salas SP, Marshall G, Gutierrez BL, and Rosso P.** Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with preeclampsia or fetal growth restriction. *Hypertension* 47: 203-208, 2006.
42. **Salyer SA, Parks J, Barati MT, Lederer ED, Clark BJ, Klein JD, and Khundmiri SJ.** Aldosterone regulates Na(+), K(+) ATPase activity in human renal proximal tubule cells through mineralocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta* 1833: 2143-2152, 2013.
43. **Schreuder MF, Nyengaard JR, Fodor M, van Wijk JA, and Delemarre-van de Waal HA.** Glomerular number and function are influenced by spontaneous and induced low birth weight in rats. *J Am Soc Nephrol* 16: 2913-2919, 2005.

44. **Schreuder MF, Van Wijk JA, Fodor M, and Delemarre-van de Waal HA.** Influence of intrauterine growth restriction on renal function in the adult rat. *J Physiol Biochem* 63: 213-219, 2007.
45. **Shen Q, Xu H, Wei LM, Chen J, Liu HM, and Guo W.** A comparative proteomic study of nephrogenesis in intrauterine growth restriction. *Pediatr Nephrol* 25: 1063-1072, 2010.
46. **Somm E, Vauthay DM, Guerardel A, Toulotte A, Cettour-Rose P, Klee P, Meda P, Aubert ML, Huppi PS, and Schwitzgebel VM.** Early metabolic defects in dexamethasone-exposed and undernourished intrauterine growth restricted rats. *PLoS ONE* 7: e50131, 2012.
47. **Soundararajan R, Melters D, Shih IC, Wang J, and Pearce D.** Epithelial sodium channel regulated by differential composition of a signaling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7804-7809, 2009.
48. **Soundararajan R, Wang J, Melters D, and Pearce D.** Glucocorticoid-induced Leucine zipper 1 stimulates the epithelial sodium channel by regulating serum- and glucocorticoid-induced kinase 1 stability and subcellular localization. *J Biol Chem* 285: 39905-39913, 2010.
49. **Soundararajan R, Zhang TT, Wang J, Vandewalle A, and Pearce D.** A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport. *J Biol Chem* 280: 39970-39981, 2005.
50. **Soundararajan R, Ziera T, Koo E, Ling K, Wang J, Borden SA, and Pearce D.** Scaffold protein connector enhancer of kinase suppressor of Ras isoform 3 (CNK3) coordinates assembly of a multiprotein epithelial sodium channel (ENaC)-regulatory complex. *J Biol Chem* 287: 33014-33025, 2012.
51. **Zhang W, Xia X, Reisenauer MR, Rieg T, Lang F, Kuhl D, Vallon V, and Kone BC.** Aldosterone-induced Sgk1 relieves Dot1a-Af9-mediated transcriptional repression of epithelial Na⁺ channel alpha. *J Clin Invest* 117: 773-783, 2007.
52. **Ziera T, Irlbacher H, Fromm A, Latouche C, Krug SM, Fromm M, Jaisser F, and Borden SA.** Cnksr3 is a direct mineralocorticoid receptor target gene and plays a key role in the regulation of the epithelial sodium channel. *FASEB J* 23: 3936-3946, 2009.

TABLES

TABLE 1. Primer designs used for RT-PCR

| Gene | FP: Forward Primer (5' → 3') | RP: Reverse Primer (5' → 3') | Size (bp) |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------|
| Atp1a1 | FP: AGATTTGAGCCGAGGCCTAACACC | RP: TCCGCCCTTCACCTCCACCAGAT | 418 |
| Atp1b1 | FP: TGGAGACTTACCCTCTGACGATG | RP: GGCTAGTGGGAAAGATTTGTGC | 357 |
| Gapdh | FP: GGTGATGCTGGTGCTGAGTA | RP: GGATGCAGGGATGATGTTCT | 369 |

TABLE 2. QIAGEN Primers for qRT-PCR

| Gene (GenBank Accession #) | QIAGEN QT Primer Assay |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| Nr3c2 (NM_013131) | QT00183890 |
| Sgk1 (NM_019232) | QT00179536 |
| Scnn1a (NM_031548) | QT00185353 |
| Cnksr3 (NM_001012061) | QT00402444 |
| Tsc22d3 (NM_031345) | QT00404075 |
| Rplp0 (NM_022402) | QT02348178 |

TABLE 3. Western Blot conditions for all proteins

| Protein | SDS-PAGE concentration (%) | Amount loaded (μ g/lane) | Blocking solution | Primary antibody | |
|---|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|------------------|----------------------------|
| | | | | Dilution | Manufacturer |
| MR | 8 | 50 | 1% non-fat milk / TBST-0.05% | 1:100 | Dr. Gomez-Sanchez |
| SGK1 | 10 | 40 | 5% non-fat milk / PBST-0.1% | 1:1,000 | Cell Signalling Technology |
| pSGK1 (Thr 256) | 10 | 40 | 5% BSA / PBST- 0.1% | 1:1,000 | Santa Cruz Biotechnology |
| α-ENaC | 8 | 50 | 5% BSA / PBST- 0.1% | 1:500 | EMD Millipore Inc. |
| CNKSR3 | 8 | 30 | 5% non-fat milk / PBST-0.1% | 1:1,000 | Santa Cruz Biotechnology |
| GILZ | 15 | 20 | 5% non-fat milk / PBST-0.1% | 1:1,000 | Santa Cruz Biotechnology |
| Na⁺-K⁺- ATPase α_1 | 7 | 3 | 5% non-fat milk / PBST-0.1% | 1:20,000 | Upstate Biotechnology |
| Na⁺-K⁺- ATPase β_1 | 15 | 50 | 5% non-fat milk / PBST-0.1% | 1:500 | Upstate Biotechnology |

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Gene (A) and protein (B) expression of MR [*Nr3c2*] in kidneys of male and female foetuses on day 22. Control (white bars) and IUGR (gray bars) groups. Results are expressed as a ratio of the gene of interest on *Rplp0* gene or protein of interest on β -actin expression. A representative immunoblot is shown; MR: 107 kDa, β -actin: 42 kDa. $*P < 0.05$

Figure 2: Gene (A) and protein (B) expression of SGK1 [*Sgk1*], and protein expression of pSGK(Thr256) (C) in kidneys of male and female foetuses on day 22. Control (white bars) and IUGR (gray bars) groups. Results are expressed as a ratio of the gene of interest on *Rplp0* gene or protein of interest on β -actin expression. A representative immunoblot is shown; SGK1: 48 kDa, pSGK1(Thr256): 54 kDa, β -actin: 42 kDa. $**P < 0.01$

Figure 3: Gene (A) and protein (B) expression of α -ENaC [*Scnn1a*] in kidneys of male and female foetuses on day 22. Control (white bars) and IUGR (gray bars) groups. Results are expressed as a ratio of the gene of interest on *Rplp0* gene or protein of interest on β -actin expression. A representative immunoblot is shown; α -ENaC: 75 kDa, β -actin: 42 kDa. $**P < 0.01$

Figure 4: Gene (A) and protein (B) expression of CNKSR3 [*Cnksr3*] in kidneys of male and female foetuses on day 22. Control (white bars) and IUGR (gray bars) groups. Results are expressed as a ratio of the gene of interest on *Rplp0* gene or protein of interest on β -actin expression. A representative immunoblot is shown; Bands are separated as samples were not in consecutive wells; CNKSR3: 62 kDa, β -actin: 42 kDa.

Figure 5: Gene expression of GILZ [*Tsc22d3*] in kidneys of male and female fetuses on day 22. Control (white bars) and IUGR (gray bars) groups. Results are expressed as a ratio of the gene of interest on *Rplp0* gene. **P* < 0.05

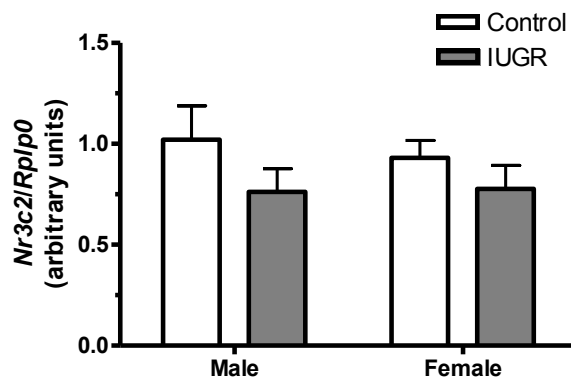
Figure 6: : Gene (A) and protein (B) expression of Na⁺-K⁺-ATPase α_1 [*Atp1a1*] in kidneys of male and female fetuses on day 22. Control (white bars) and IUGR (gray bars) groups. Results are expressed as a ratio of the gene of interest on *Gapdh* gene or protein of interest on β -actin expression. A representative immunoblot is shown; Bands are separated as samples were not in consecutive wells; Na⁺-K⁺-ATPase α_1 : 100 kDa, β -actin: 42 kDa. **P* < 0.05

Figure 7: Gene expression of Na⁺-K⁺-ATPase β_1 [*Atp1b1*] in kidneys of male and female fetuses on day 22. Control (white bars) and IUGR (gray bars) groups. Results are expressed as a ratio of the gene of interest on *Gapdh* gene. **P* < 0.05

FIGURES

Figure 1

A



B

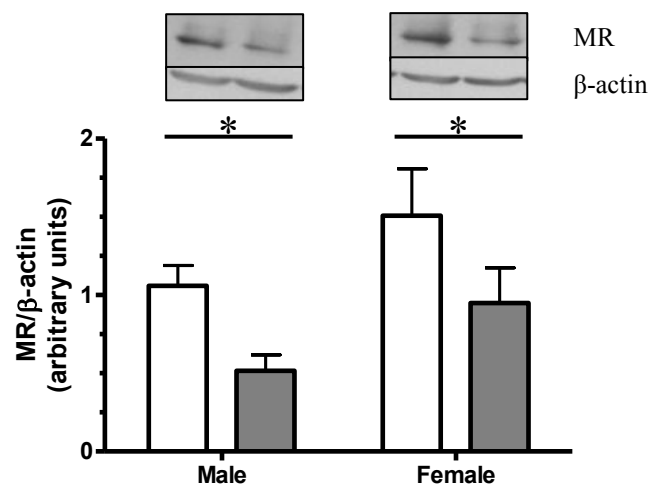


Figure 2

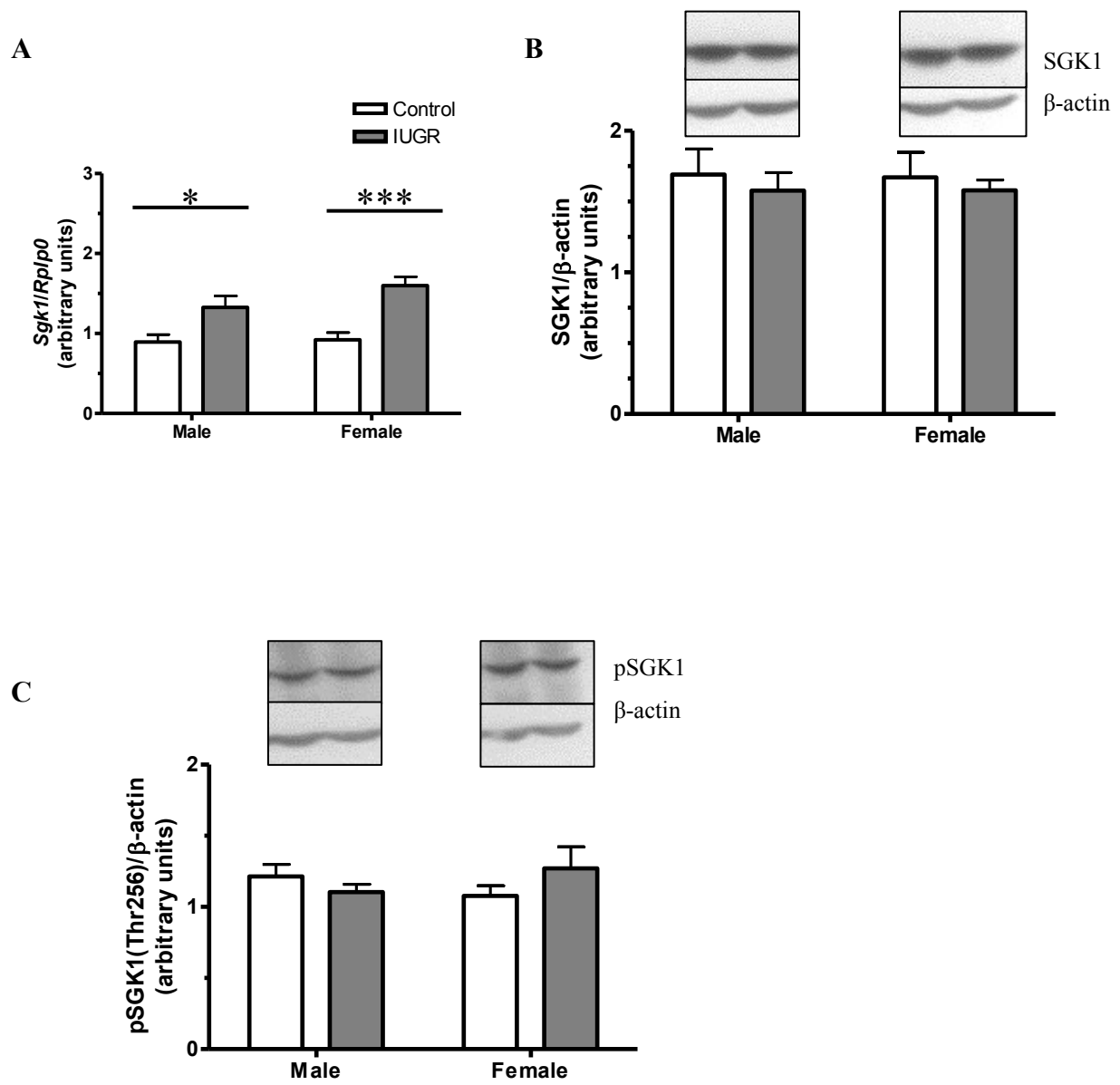
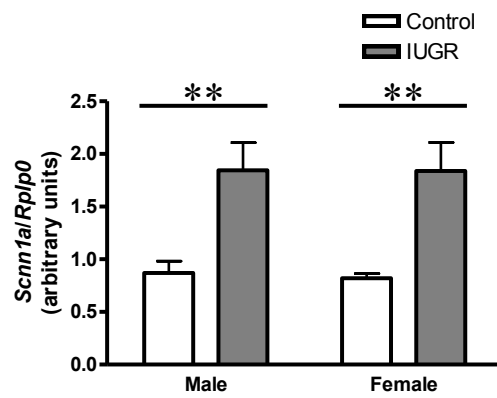


Figure 3

A



B

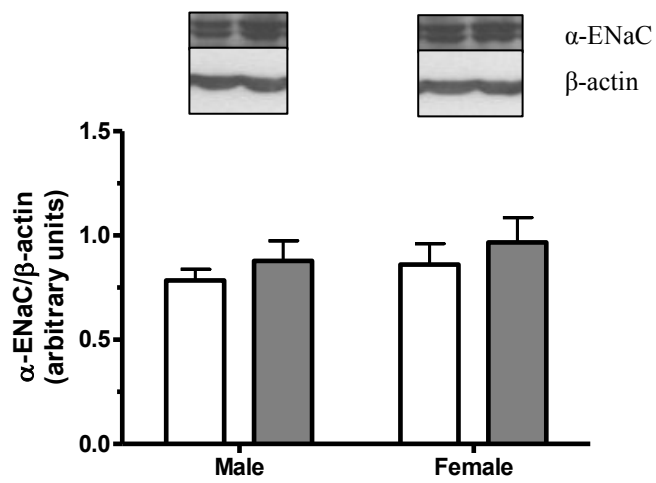
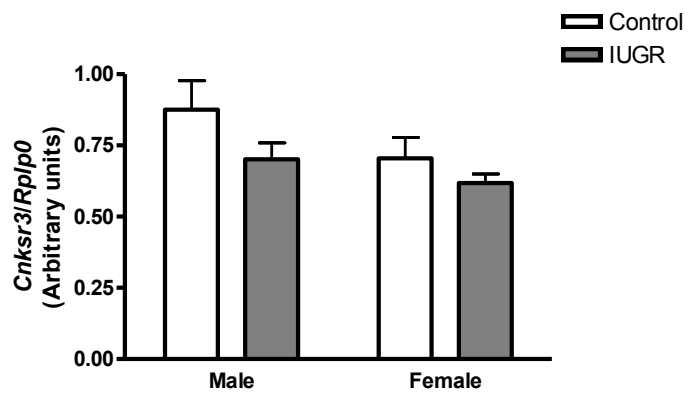


Figure 4

A



B

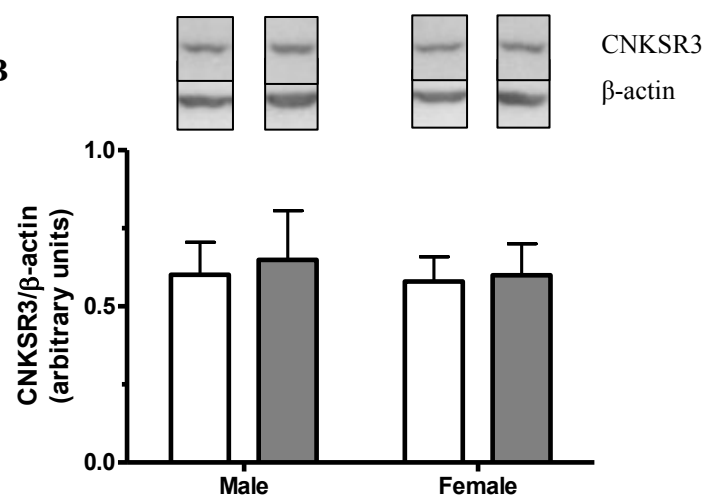


Figure 5

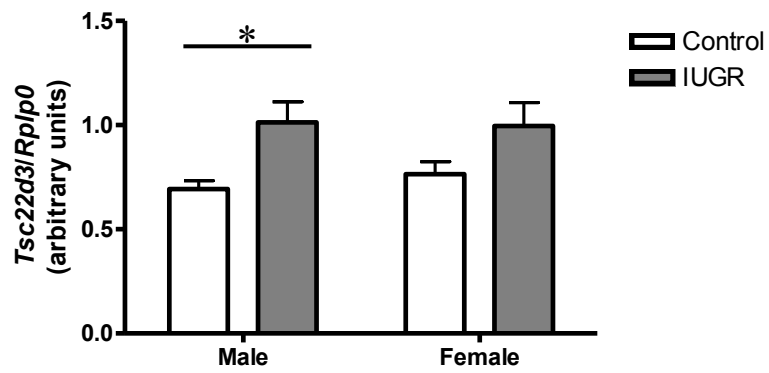
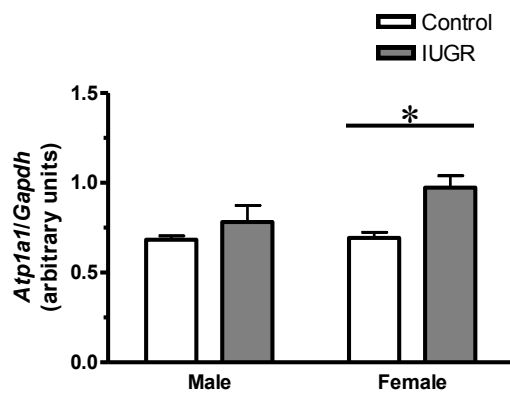


Figure 6

A



B

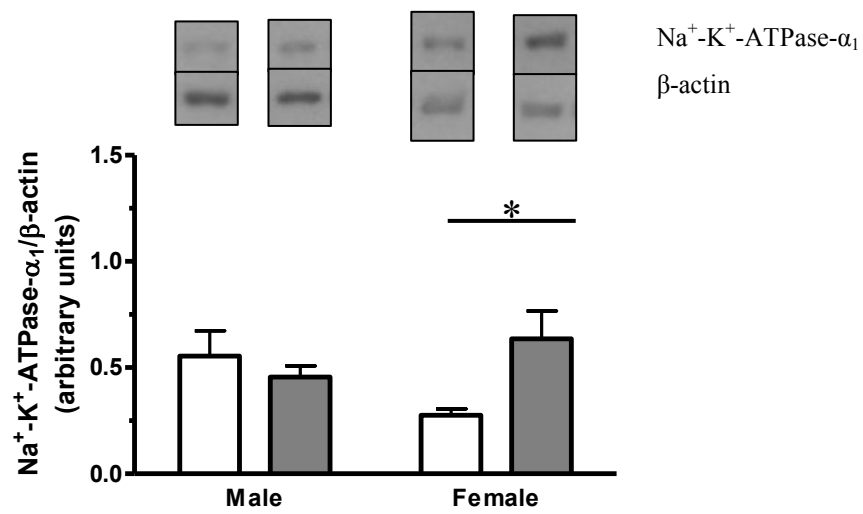
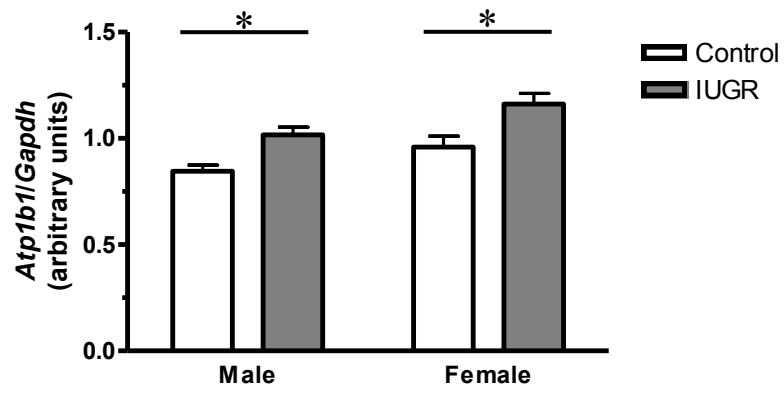


Figure 7



2.3 Résultats supplémentaires

Le MR est redirigé vers le noyau pour la transcription de gènes. Un des objectifs était de mesurer l'expression protéique de ce récepteur dans le noyau. L'extraction nucléaire a été faite en suivant le protocole fourni par le manufacturier. Le MR n'était pas détecté dans les échantillons nucléaires, malgré la présence de lamine B1, protéine de la lamina nucléaire (fig. 10). Ceci confirme que l'extraction nucléaire s'est bien déroulée. Il se peut que l'anticorps utilisé n'était pas adéquat ou que la concentration de protéines nucléaires était insuffisante pour sa détection. Le MR total a été détecté avec un anticorps développé en laboratoire (Gomez-Sanchez, de Rodriguez et al. 2006) alors que pour l'extraction nucléaire, l'anticorps était commercial.

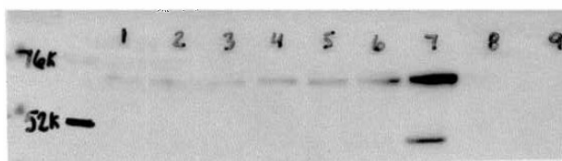


Figure 10. Expression protéique de lamine B1. À gauche, l'échelle moléculaire indiquant 76 et 52 kDa. Puits 1-2 : poumon foetal (20 et 40 µg); puits 3-4 : rein foetal (20 et 40 µg); puits 5-6 : fraction cytosolique de rein foetal (20 et 40 µg); puit 7 : fraction nucléaire de rein foetal (20 µL); puit 8 : poumon adulte (25 µg); puit 9 : contrôle négatif (Poids moléculaire de lamine B1 \approx 68 kDa)

Par ailleurs, la protéine GILZ était indétectable dans les reins fœtaux lors des immunobuvardages de type Western, malgré sa détection dans le contrôle positif commercial. D'après une étude, GILZ interagissait avec SUMO1 dans les thymocytes (Delfino, Spinicelli et al. 2011). Une immunoprécipitation avec anti-SUMO1 et un immunobuvardage de type Western control GILZ ont été faits. GILZ était toujours indétectable dans les échantillons rénaux.

3. Discussion

Dans cette section, une discussion générale de l'étude sera faite. De plus, certaines limites et des perspectives seront abordées.

3.1 La voie des minéralocorticoïdes chez les fœtus RCIU

La diète faible en sodium donnée aux rates gestantes induit une RCIU en réduisant l'expansion volémique maternelle normalement observée lors de la grossesse. Cette réduction de volume sanguin chez la femme est similaire à la restriction de croissance fœtale et la prééclampsie (Salas, Rosso et al. 1993, Silver, Seebeck et al. 1998). Dans le modèle de RCIU utilisée, une augmentation d'aldostérone plasmatique chez les fœtus est observée. Ceci concorde avec une étude démontrant que les nouveau-nés avec un plus petit poids avaient un taux d'aldostérone plus élevé que les enfants nés avec un poids approprié (Doerr, Versmold et al. 1989). Leur étude s'est déroulée de 2 heures jusqu'à 7 jours après la naissance et les bébés de plus petit poids avaient toujours un plus haut taux d'aldostérone. Dans le modèle utilisé dans la présente étude, une diminution de la filtration glomérulaire et de l'excrétion de sodium, et une pression systolique élevée sont observées chez les rats à l'âge de 12 semaines (Battista, Oligny et al. 2002). Ainsi, nous sommes venus à l'hypothèse que le rein fœtal mettra en place des mécanismes pour s'adapter à la situation de RCIU et, ceux-ci pourront avoir des conséquences à long terme. Les objectifs de cette recherche étaient de quantifier l'expression génique et protéique des composants de la voie de réabsorption sodique au niveau du rein; cette voie contribue grandement à la régulation de la pression artérielle. La programmation *in utero* est un facteur important dans le développement de maladies au cours de la vie adulte; c'est alors essentiel d'étudier les modifications rénales chez le fœtus.

Tout d'abord, bien que les résultats obtenus démontrent que l'expression de l'ARNm du récepteur est similaire dans les reins de fœtus témoins et RCIU, l'expression protéique est diminuée. Le MR pourrait être dégradé après liaison avec l'aldostérone tel que vu *in vitro* (Faresse, Vitagliano et al. 2012) ou la synthèse protéique pourrait être diminuée. Cette baisse de niveau de récepteur doit être regardée en profondeur pour suivre l'impact sur la transcription des gènes cibles. Ensuite, l'expression d'ENaC [*Scnn1a*], gène ciblé par

l'aldostérone, est augmentée, mais l'expression de la protéine est inchangée. Ce résultat laisse croire qu'il existe une régulation post-transcriptionnelle privilégiant la dégradation de l'ARNm au lieu de la synthèse protéique ou que les protéines exhibent un plus grand « turnover » (balance entre la synthèse et la dégradation protéique). Il existe aussi la possibilité d'une corrélation faible entre l'ARNm et la protéine où le niveau de l'un ne se traduit pas directement à un niveau similaire de l'autre. En effet, l'expression génique d'ENaC était supérieure à son expression protéique dans les reins de rats mâles pendant les 2 jours suivants l'induction du syndrome néphrotique (Audige, Yu et al. 2003). Par ailleurs, il a été démontré que dans les cellules, il existe des vésicules d'ENaC prêts à être distribuées à la membrane après stimulation par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Edinger, Bertrand et al. 2012). Il se peut que la quantité totale d'ENaC soit similaire dans les 2 groupes, mais que les reins provenant de RCIU aient une plus grande expression membranaire du canal. La quantification de cette portion membranaire d'ENaC est l'une des perspectives pour ce projet.

L'effet stimulateur de l'aldostérone sur SGK1 [*Sgk1*] est bien connu (Naray-Fejes-Toth and Fejes-Toth 2000, Hou, Speirs et al. 2002, McCormick, Bhalla et al. 2005). Les reins fœtaux RCIU ont une plus grande expression de ce gène, mais la protéine est inchangée. Un modèle proposé par Brickley et collègues suppose que SGK1 devient un substrat pour Nedd4-2 en le phosphorylant. SGK1 serait alors ubiquitiné par Nedd4-2 et dégradé via le protéasome (Brickley, Mikosz et al. 2002). Dans une culture cellulaire, la surexpression de Nedd4-2 diminue l'expression protéique de SGK1 et sa demi-vie, passant de 29 minutes à 6 minutes (Zhou and Snyder 2005). L'activation complète de SGK1 requiert une phosphorylation au résidu thréonine 256. Dans les fœtus, l'expression rénale de pSGK1(Thr 256) n'était pas différente entre témoins et RCIU. L'interaction de SGK1 avec plusieurs protéines, dont Nedd4-2, entraînerait alors un plus grand « turnover » et subséquemment, des niveaux similaires entre les deux groupes expérimentaux.

La découverte de *Cnksr3* comme gène contrôlé par l'aldostérone est récente (Ziera, Irlbacher et al. 2009). Cette protéine fait partie de la famille des protéines d'échafaudage. L'étude de Ziera et collègues a démontré par immunoprécipitation de la chromatine que le

promoteur de *Cnksr3* possède deux régions capable de lier le MR. De plus, une surexpression de la protéine CNKSR3 est associée à un transport sodique transépithélial élevé. Dans le modèle que nous utilisons, malgré une augmentation d'aldostérone plasmatique et une tendance à la diminution de l'expression génique chez les RCIU ($P = 0.08$), aucune différence pour l'expression protéique n'est observée entre les reins fœtaux de témoins et de RCIU. La différence de méthodologie entre les deux études pourrait expliquer la diminution de l'ARNm et le niveau protéique inchangé dans notre modèle. En effet, ce groupe de chercheurs ont isolé les tubules de souris adultes alors que nous avons utilisé les reins complets de fœtus. Effectivement, la quantité totale de protéines dans le rein pourrait masquer les variations dans les portions ciblées par l'aldostérone. De plus, les fœtus RCIU ont un taux d'aldostérone sérique d'environ 7 pmol/L (Bibeau, Battista et al. 2010) alors que Ziera et collègues ont stimulé les cellules HEK293-hMR⁺ avec 10 nmol/L d'aldostérone (Ziera, Irlbacher et al. 2009); cette différence de taux hormonal pourrait suggérer que *Cnksr3* ne soit pas fortement stimulé dans les reins fœtaux RCIU. Dans le modèle animal utilisé, l'expression génique de GILZ [*Tsc22d3*] est augmentée dans les reins fœtaux RCIU. Effectivement, une administration d'aldostérone chez le rat augmente la quantité d'ARNm de GILZ (Muller, Parnova et al. 2003). Malgré la détection du gène dans les reins de fœtus, la protéine GILZ était indétectable dans ces tissus, peu importe le statut expérimental ou le sexe. La présence de GILZ est détectée dans le contrôle positif commercial, alors le protocole d'immunobuvardage de type Western était conforme. Il se peut que dans les tissus animaux, GILZ est lié à d'autres protéines et que ces liens ne soient pas brisés par la dénaturation. D'autres études doivent être poursuivies pour confirmer cette hypothèse.

Selon le sexe biologique, les conséquences d'une RCIU peuvent varier. En effet, Ozaki et collègues démontrent que les rats ayant subi une RCIU ont une fonction cardiovasculaire affectée et que l'atteinte est plus prononcée chez les mâles (Ozaki, Nishina et al. 2001). Également, l'expression protéique d'AT₁R et AT₂R est différente entre des moutons mâles et femelles et ce ne sont que les mâles qui ont une diminution du nombre de glomérules (Gilbert, Ford et al. 2007). Une hausse du taux de testostérone est observée du 18^e au 19^e jour de gestation chez les fœtus mâles (Baum, Woutersen et al. 1991). C'est alors possible que ce

changement hormonal puisse amener des différences entre les fœtus de différent sexe. À la puberté, les hormones sexuelles femelles jouent un rôle bénéfique en prévenant l'augmentation de la pression artérielle (von Eiff, Lutz et al. 1985, Ojeda, Grigore et al. 2007, Campos, Sartorio et al. 2013) tandis que la testostérone n'a pas cet effet bénéfique (Ojeda, Grigore et al. 2007). Dans ce projet, l'expression des ARNm ou des protéines de la voie des minéralocorticoïdes ne varie pas entre les fœtus mâles et femelles.

Plusieurs modèles expérimentaux confirment que la fonction ou les maladies rénales peuvent être programmées *in utero* par différentes voies (Woods and Rasch 1998, Vehaskari, Stewart et al. 2004). Les altérations moléculaires ou physiologiques peuvent différer selon le modèle animal utilisé. D'abord, certains modèles de programmation fœtale décrivent une augmentation de AT₁R (Sahajpal and Ashton 2003, Ruster, Sommer et al. 2006) alors que d'autres voient une diminution de ce récepteur (Vaccari, Mesquita et al. 2013). Les résultats opposés peuvent être expliqués par le type d'animal choisi ou le protocole utilisé pour induire la RCIU, mais ils confirment tous qu'un changement au sein du SRAA est un facteur prédisposant aux problèmes rénaux. Par ailleurs, le modèle créé en laboratoire démontre une augmentation de la concentration d'aldostérone et une diminution de la concentration de corticostérone chez les fœtus (Bibeau, Battista et al. 2010). Ceci s'oppose à la hausse de corticostérone observée chez des rats fœtaux de 21 jours dans un autre modèle de RCIU (Baserga, Bares et al. 2009). Les altérations du SRAA et de la voie de rétention sodique notées dans le modèle de RCIU créé en laboratoire pourraient être responsables de la filtration glomérulaire diminuée observée à l'âge adulte et pourraient expliquer les signes d'hypertension (Epstein 2001).

En guise de synthèse des résultats, la figure 8 de l'introduction est reprise ci-dessous (Figure 11). L'expression génique de *Sgk1*, *Tsc22d3*, *Scnn1a* et *Atp1b1* est augmentée dans les fœtus RCIU des deux sexes alors que celle de *Atp1a1* n'est qu'augmentée chez les femelles. Comme indiqué par une petite flèche, l'expression de l'ARNm de *Cnksr3* n'est pas augmentée dans ce modèle de RCIU. Les protéines étudiées dans cette voie de signalisation sont de niveau similaire entre les animaux témoins et ceux ayant subi une RCIU, d'où l'intérêt de se

questionner sur le phénomène de la traduction de ces ARNm ou l'approche de différentes techniques plus sensibles.

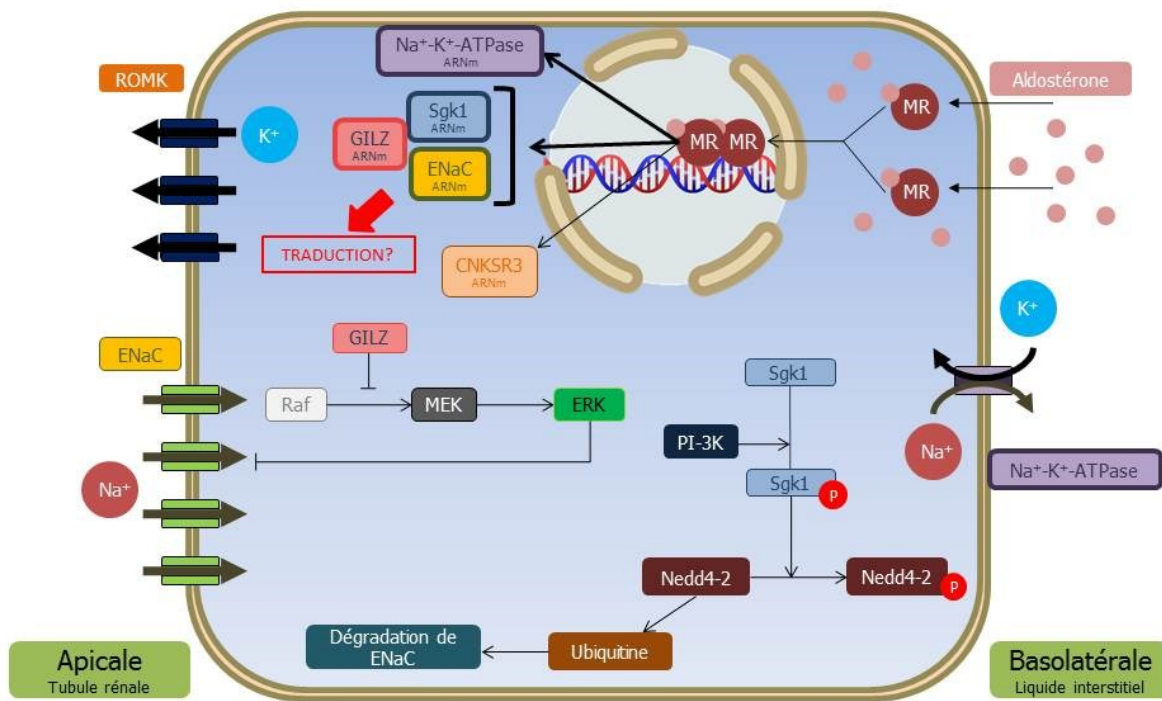


Figure 11. Signalisation intracellulaire rénale selon le modèle expérimental de RCIU. (Adapté de Houde 2008)

3.2 Limites expérimentales

Les rats utilisés dans ce modèle de RCIU sont de souche Sprague-Dawley, réputée pour leur variabilité génétique. En étant un avantage pour bien mimer la génétique hétérogène humaine, c'est aussi un inconvénient puisque l'expression génique et/ou protéique entre les animaux démontre une plus grande variabilité pouvant masquer des différences entre les groupes. Par contre, la variabilité de l'environnement dans lequel sont logés les animaux est stable (température, luminosité, etc.), la seule variable étant la diète pendant la dernière

semaine de gestation. Le modèle RCIU utilisé ne reflète pas exactement la situation humaine puisque la diète en sodium est très restreinte. Par contre, c'est un outil pour mieux comprendre l'impact d'une diminution de perfusion utéroplacentaire sur le fœtus. Le développement rénal chez l'humain se termine vers le 8^e mois de grossesse. Chez le rat, la néphrogénèse se poursuit jusqu'au 10^e jour postnatal. Des facteurs extrautérins pourraient alors influencer les reins du rongeur puisqu'ils ne sont pas au même stade de développement.

Également, les techniques de qRT-PCR et d'immunobuvardages de type Western comportent leurs limites expérimentales : contaminations, présence de RNase dans un milieu sans-RNase, anticorps ne reconnaissant pas la protéine, etc. Afin de réduire la possibilité qu'un de ces facteurs interfèrent, la préparation des échantillons et le suivi des protocoles ont été faits de manière rigoureuse. Par contre, même avec une technique de travail adéquate, le signal de la protéine peut interférer avec la quantification. Ceci est montré à la figure 3B de l'article, où les bandes d'actine se touchent, même avec une grande dilution de l'anticorps.

3.3 Perspectives

Plusieurs perspectives pour continuer ce projet sont envisagées. D'abord, la voie des minéralocorticoïdes pourraient être étudiée à différents âges. L'activité de cette voie est augmentée dans une cohorte d'hommes et de femmes (67 à 78 ans) ayant un petit poids à la naissance (Reynolds, Walker et al. 2009). Le transporteur NCC, classifié comme cible de l'aldostérone (Arroyo, Lagnaz et al. 2011, Ko, Mistry et al. 2013) serait alors une autre protéine cible dans la cascade de rétention sodique. Des modifications dans cette voie durant la vie adulte peuvent conduire à l'hypertension (Kawarazaki and Fujita 2013); d'où l'importance de mieux comprendre l'effet de la RCIU en fonction de l'âge.

Par ailleurs, le développement embryonnaire et fœtal subit une programmation épigénétique. La méthylation du promoteur des gènes cibles de l'aldostérone devrait être étudiée puisqu'une hypométhylation mène à une plus grande expression génique. Cela pourrait expliquer l'augmentation de certains d'entre eux chez le fœtus RCIU. Certaines études ont

aussi démontré une différence dans l'expression génique dans le rein et autres organes due à des modifications épigénétiques (Bogdarina, Welham et al. 2007, Fu, Yu et al. 2009, Baserga, Kaur et al. 2010, Vo, Revesz et al. 2013).

De plus, l'aldostérone affecte seulement le ASDN, donc un protocole d'isolement des tubules rénaux devrait être établi (Wagner, Lukewille et al. 2003). Ceci permettrait la détection plus précise des protéines dans les cellules d'intérêt. La présence du canal à la membrane plasmique serait facilitée par cette technique puisqu'ENaC se trouve principalement dans les cellules de l'ASDN. En utilisant les lysats cellulaires totaux, il y a évidemment une perte de la membrane lors de la centrifugation. Un protocole similaire à celui pour la détection de la Na^+/K^+ -ATPase pourrait alors être établi. L'activité d'ENaC pourrait être étudiée électrophysiologiquement (via le « patch-clamp »), similairement à une étude récente (Mironova, Bugay et al. 2013).

Du côté anatomique, il serait intéressant d'analyser le nombre de glomérules et leur volume puisqu'il semble avoir une diminution du nombre de néphrons suite à une RCIU (Bauer, Walter et al. 2002, Schreuder, Nyengaard et al. 2005). Le nombre de glomérules par rapport à leur aire chez les fœtus, nouveau-nés et adultes a été rapporté antérieurement. Il n'y avait pas de différence significative dans les valeurs, mais il faut noter que les animaux n'ont pas été séparés par sexe. Comme ce ne sont que les femelles qui, à 12 semaines, ont un taux plasmatique de créatinine élevé (Battista, Oligny et al. 2002), il serait important de différencier les mâles et les femelles dès le stade fœtal pour vérifier s'il a un lien possible entre une diminution du nombre de glomérules et la fonction rénale.

Toutes les perspectives énumérées ci-haut permettront d'élucider le mécanisme mis en place par le fœtus pour s'adapter à un environnement utérin sous-optimal. Elles permettront ainsi de faire des liens entre les adaptations et l'incidence de maladies observée au courant de la vie. À long terme, cette étude permettra l'exploration de voies importantes dans la prévention de la RCIU et au développement de traitements afin de minimiser les conséquences de la RCIU dans la vie postnatale.

4. Bibliographie

Alexander, B. T. (2003). "Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring." Hypertension **41**(3): 457-462.

Alexandre-Gouabau, M. C., F. Courant, G. Le Gall, T. Moyon, D. Darmaun, P. Parnet, B. Coupe and J. P. Antignac (2011). "Offspring metabolomic response to maternal protein restriction in a rat model of intrauterine growth restriction (IUGR)." J Proteome Res **10**(7): 3292-3302.

American College of, O. and Gynecologists (2013). "ACOG Practice bulletin no. 134: fetal growth restriction." Obstet Gynecol **121**(5): 1122-1133.

Arroyo, J. P., D. Lagnaz, C. Ronzaud, N. Vazquez, B. S. Ko, L. Moddes, D. Ruffieux-Daidie, P. Hausel, R. Koesters, B. Yang, J. B. Stokes, R. S. Hoover, G. Gamba and O. Staub (2011). "Nedd4-2 modulates renal Na⁺-Cl⁻ cotransporter via the aldosterone-SGK1-Nedd4-2 pathway." J Am Soc Nephrol **22**(9): 1707-1719.

Audige, A., Z. R. Yu, B. M. Frey, D. E. Uehlinger, F. J. Frey and B. Vogt (2003). "Epithelial sodium channel (ENaC) subunit mRNA and protein expression in rats with puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome." Clin Sci (Lond) **104**(4): 389-395.

Ayrolidi, E., O. Zollo, A. Macchiarulo, B. Di Marco, C. Marchetti and C. Riccardi (2002). "Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Inhibits the Raf-Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway by Binding to Raf-1." Molecular and Cellular Biology **22**(22): 7929-7941.

Barker, D. J., A. R. Bull, C. Osmond and S. J. Simmonds (1990). "Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life." BMJ **301**(6746): 259-262.

Barker, D. J., C. Osmond, J. Golding, D. Kuh and M. E. Wadsworth (1989). "Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease." BMJ **298**(6673): 564-567.

Baserga, M., A. L. Bares, M. A. Hale, C. W. Callaway, R. A. McKnight, P. H. Lane and R. H. Lane (2009). "Uteroplacental insufficiency affects kidney VEGF expression in a model of

IUGR with compensatory glomerular hypertrophy and hypertension." Early Hum Dev **85**(6): 361-367.

Baserga, M., R. Kaur, M. A. Hale, A. Bares, X. Yu, C. W. Callaway, R. A. McKnight and R. H. Lane (2010). "Fetal growth restriction alters transcription factor binding and epigenetic mechanisms of renal 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in a sex-specific manner." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **299**(1): R334-342.

Bassan, H., L. L. Trejo, N. Kariv, M. Bassan, E. Berger, A. Fattal, I. Gozes and S. Harel (2000). "Experimental intrauterine growth retardation alters renal development." Pediatr Nephrol **15**(3-4): 192-195.

Battista, M. C., E. Calvo, A. Chorvatova, B. Comte, J. Corbeil and M. Brochu (2005). "Intra-uterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats." J Physiol **565**(Pt 1): 197-205.

Battista, M. C., L. L. Oligny, J. St-Louis and M. Brochu (2002). "Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood." Am J Physiol Endocrinol Metab **283**(1): E124-131.

Bauer, R., B. Walter, K. Bauer, R. Klupsch, S. Patt and U. Zwiener (2002). "Intrauterine growth restriction reduces nephron number and renal excretory function in newborn piglets." Acta Physiol Scand **176**(2): 83-90.

Bauer, R., B. Walter, W. Ihring, H. Kluge, V. Lampe and U. Zwiener (2000). "Altered renal function in growth-restricted newborn piglets." Pediatr Nephrol **14**(8-9): 735-739.

Baum, M. J., P. J. Woutersen and A. K. Slob (1991). "Sex difference in whole-body androgen content in rats on fetal days 18 and 19 without evidence that androgen passes from males to females." Biol Reprod **44**(5): 747-751.

Bertram, C., A. R. Trowern, N. Copin, A. A. Jackson and C. B. Whorwood (2001). "The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and

type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero." Endocrinology **142**(7): 2841-2853.

Bibeau, K., M. C. Battista, V. Houde and M. Brochu (2010). "Fetal adrenal gland alterations in a rat model of adverse intrauterine environment." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **298**(4): R899-911.

Bogdarina, I., S. Welham, P. J. King, S. P. Burns and A. J. Clark (2007). "Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension." Circ Res **100**(4): 520-526.

Boyd, J. E., W. P. Palmore and P. J. Mulrow (1971). "Role of potassium in the control of aldosterone secretion in the rat." Endocrinology **88**(3): 556-565.

Brenner, B. M., D. L. Garcia and S. Anderson (1988). "Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other?" Am J Hypertens **1**(4 Pt 1): 335-347.

Brenner, B. M. and F. C. Rector (2008). Brenner & Rector's the kidney. Philadelphia, Saunders Elsevier.

Brickley, D. R., C. A. Mikosz, C. R. Hagan and S. D. Conzen (2002). "Ubiquitin modification of serum and glucocorticoid-induced protein kinase-1 (SGK-1)." J Biol Chem **277**(45): 43064-43070.

Brodsky, D. and H. Christou (2004). "Current concepts in intrauterine growth restriction." J Intensive Care Med **19**(6): 307-319.

Brodsky, D. and M. A. Ouellette (2008). Primary care of the premature infant. Philadelphia, PA, Saunders.

Brown, R., A. Ollerstam, B. Johansson, O. Skott, S. Gebre-Medhin, B. Fredholm and A. E. Persson (2001). "Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A1 receptor-deficient mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(5): R1362-1367.

Buffat, C., F. Boubred, F. Mondon, S. T. Chelbi, J. M. Feuerstein, M. Lelievre-Pegorier, D. Vaiman and U. Simeoni (2007). "Kidney gene expression analysis in a rat model of intrauterine growth restriction reveals massive alterations of coagulation genes." Endocrinology **148**(11): 5549-5557.

Campos, C., C. L. Sartorio, K. R. Casali, R. O. Fernandes, S. Llesuy, A. S. da Rosa Araujo, A. Bello-Klein and K. Rigatto (2013). "Low dose estrogen is as effective as high dose treatment in rats with postmenopausal hypertension." J Cardiovasc Pharmacol.

Cannon, P. J., R. P. Ames and J. H. Laragh (1966). "Relation between Potassium Balance and Aldosterone Secretion in Normal Subjects and in Patients with Hypertensive or Renal Tubular Disease." Journal of Clinical Investigation **45**(6): 865-&.

Carey, R. M. and S. H. Padia (2008). "Angiotensin AT2 receptors: control of renal sodium excretion and blood pressure." Trends in Endocrinology & Metabolism **19**(3): 84-87.

Cecil, R. L. G. L. S. A. I. (2012). Goldman's Cecil medicine. Philadelphia, Elsevier/Saunders/.

Cha, J. H., Y. H. Kim, J. Y. Jung, K. H. Han, K. M. Madsen and J. Kim (2001). "Cell proliferation in the loop of henle in the developing rat kidney." J Am Soc Nephrol **12**(7): 1410-1421.

Chen, P. Y., A. Ganguly, L. Rubbi, L. D. Orozco, M. Morselli, D. Ashraf, A. Jaroszewicz, S. Feng, S. E. Jacobsen, A. Nakano, S. U. Devaskar and M. Pellegrini (2013). "Intrauterine calorie restriction affects placental DNA methylation and gene expression." Physiol Genomics **45**(14): 565-576.

Chen, W., Y. Chen, B. E. Xu, Y. C. Juang, S. Stippec, Y. Zhao and M. H. Cobb (2009). "Regulation of a third conserved phosphorylation site in SGK1." J Biol Chem **284**(6): 3453-3460.

Cheng, C. J., G. Lozano and M. Baum (2012). "Prenatal programming of rat cortical collecting tubule sodium transport." Am J Physiol Renal Physiol **302**(6): F674-678.

Chiu, A. T., W. F. Herblin, D. E. McCall, R. J. Ardecky, D. J. Carini, J. V. Duncia, L. J. Pease, P. C. Wong, R. R. Wexler, A. L. Johnson and et al. (1989). "Identification of angiotensin II receptor subtypes." Biochem Biophys Res Commun **165**(1): 196-203.

De Blasio, M. J., K. L. Gatford, J. S. Robinson and J. A. Owens (2007). "Placental restriction of fetal growth reduces size at birth and alters postnatal growth, feeding activity, and adiposity in the young lamb." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **292**(2): R875-886.

De Giusti, V. C., M. B. Nolly, A. M. Yeves, C. I. Caldiz, M. C. Villa-Abrille, G. E. Chiappe de Cingolani, I. L. Ennis, H. E. Cingolani and E. A. Aiello (2011). "Aldosterone stimulates the cardiac Na(+)/H(+) exchanger via transactivation of the epidermal growth factor receptor." Hypertension **58**(5): 912-919.

de Onis, M., M. Blossner and J. Villar (1998). "Levels and patterns of intrauterine growth retardation in developing countries." Eur J Clin Nutr **52 Suppl 1**: S5-15.

Delfino, D. V., S. Spinicelli, N. Pozzesi, S. Pierangeli, E. Velardi, S. Bruscoli, M. P. Martelli, V. Pettirossi, L. Falchi, T. B. Kang and C. Riccardi (2011). "Glucocorticoid-induced activation of caspase-8 protects the glucocorticoid-induced protein Gilz from proteasomal degradation and induces its binding to SUMO-1 in murine thymocytes." Cell Death Differ **18**(1): 183-190.

Dickinson, H., D. W. Walker, L. Cullen-McEwen, E. M. Wintour and K. Moritz (2005). "The spiny mouse (*Acomys cahirinus*) completes nephrogenesis before birth." Am J Physiol Renal Physiol **289**(2): F273-279.

Doerr, H. G., H. T. Versmold, F. Bidlingmaier and W. G. Sippell (1989). "Adrenocortical steroids in small-for-gestational-age term infants during the early neonatal period." Pediatr Res **25**(2): 115-118.

Dooley, R., B. J. Harvey and W. Thomas (2012). "Non-genomic actions of aldosterone: from receptors and signals to membrane targets." Mol Cell Endocrinol **350**(2): 223-234.

Dowell, R. T. and C. D. Kauer (1997). "Maternal hemodynamics and uteroplacental blood flow throughout gestation in conscious rats." Methods Find Exp Clin Pharmacol **19**(9): 613-625.

Dudek, R. W. (2013). High-Yield Embryology, Wolters Kluwer Health.

Ecelbarger, C. A., G. H. Kim, J. Terris, S. Masilamani, C. Mitchell, I. Reyes, J. G. Verbalis and M. A. Knepper (2000). "Vasopressin-mediated regulation of epithelial sodium channel abundance in rat kidney." Am J Physiol Renal Physiol **279**(1): F46-53.

Edinger, R. S., C. A. Bertrand, C. Rondandino, G. A. Apodaca, J. P. Johnson and M. B. Butterworth (2012). "The epithelial sodium channel (ENaC) establishes a trafficking vesicle pool responsible for its regulation." PLoS One **7**(9): e46593.

Edwards, C. R., P. M. Stewart, D. Burt, L. Brett, M. A. McIntyre, W. S. Sutanto, E. R. de Kloet and C. Monder (1988). "Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor." Lancet **2**(8618): 986-989.

Eknoyan, G., R. Rubens and N. Lameire (2009). "The juxtaglomerular apparatus of Norbert Goormaghtigh—a critical appraisal." Nephrology Dialysis Transplantation.

El-gammal, A. R. A., O. Y. Ibrahim, S. F. Shaban and A. A. Dessouky (2010). "Postnatal development of the albino rat renal cortex (histological study)." Egypt J Histol **33**(4): 745-756.

Epstein, M. (2001). "Aldosterone as a determinant of cardiovascular and renal dysfunction." Journal of the Royal Society of Medicine **94**(8): 378-383.

Faresse, N., J. J. Vitagliano and O. Staub (2012). "Differential ubiquitylation of the mineralocorticoid receptor is regulated by phosphorylation." FASEB J **26**(10): 4373-4382.

Figueroa, H., M. Lozano, C. Suazo, E. Eixarch, S. E. Illanes, J. E. Carreno, S. Villanueva, E. Hernandez-Andrade, E. Gratacos and C. E. Irarrazabal (2012). "Intrauterine growth restriction modifies the normal gene expression in kidney from rabbit fetuses." Early Hum Dev **88**(11): 899-904.

Fu, Q., X. Yu, C. W. Callaway, R. H. Lane and R. A. McKnight (2009). "Epigenetics: intrauterine growth retardation (IUGR) modifies the histone code along the rat hepatic IGF-1 gene." FASEB J **23**(8): 2438-2449.

Gagnon, M.-È. (2007). Programmation foetale des maladies adultes: altération au niveau rénal, Université de Montréal.

Geering, K., M. Girardet, C. Bron, J. P. Kraehenbuhl and B. C. Rossier (1982). "Hormonal regulation of (Na⁺,K⁺)-ATPase biosynthesis in the toad bladder. Effect of aldosterone and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine." J Biol Chem **257**(17): 10338-10343.

Gilbert, J. S., S. P. Ford, A. L. Lang, L. R. Pahl, M. C. Drumhiller, S. A. Babcock, P. W. Nathanielsz and M. J. Nijland (2007). "Nutrient restriction impairs nephrogenesis in a gender-specific manner in the ovine fetus." Pediatr Res **61**(1): 42-47.

Godfrey, K. M. and D. J. P. Barker (2007). "Fetal programming and adult health." Public Health Nutrition **4**(2b).

Gomez-Sanchez, C. E., A. F. de Rodriguez, D. G. Romero, J. Estess, M. P. Warden, M. T. Gomez-Sanchez and E. P. Gomez-Sanchez (2006). "Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor." Endocrinology **147**(3): 1343-1348.

Guron, G. and P. Friberg (2000). "An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development." Journal of Hypertension **18**(2): 123-137.

Hales, C. N. and D. J. Barker (1992). "Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis." Diabetologia **35**(7): 595-601.

Hou, J., H. J. Speirs, J. R. Seckl and R. W. Brown (2002). "Sgk1 gene expression in kidney and its regulation by aldosterone: spatio-temporal heterogeneity and quantitative analysis." J Am Soc Nephrol **13**(5): 1190-1198.

Houde, V. (2008). Signalisation rénale intracellulaire.

Huang, C. L. and M. G. Cogan (1987). "Atrial natriuretic factor inhibits maximal tubuloglomerular feedback response." Am J Physiol **252**(5 Pt 2): F825-828.

Iwai, N. and T. Inagami (1992). "Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor." FEBS Lett **298**(2-3): 257-260.

Johnson, L. R. and J. H. Byrne (2003). Essential Medical Physiology, Academic Press.

Kawarazaki, W. and T. Fujita (2013). "Aberrant Rac1-mineralocorticoid receptor pathways in salt-sensitive hypertension." Clin Exp Pharmacol Physiol **40**(12): 929-936.

Khoury, E. (2010). La néoglucogenèse rénale: un nouvel aspect dans la restriction de croissance intra-utérine chez le rat, Université de Montréal.

Kim, J., Y. H. Kim, J. H. Cha, C. C. Tisher and K. M. Madsen (1999). "Intercalated cell subtypes in connecting tubule and cortical collecting duct of rat and mouse." J Am Soc Nephrol **10**(1): 1-12.

Ko, B., A. C. Mistry, L. Hanson, R. Mallick, B. M. Wynne, T. L. Thai, J. L. Bailey, J. D. Klein and R. S. Hoover (2013). "Aldosterone acutely stimulates NCC activity via a SPAK-mediated pathway." Am J Physiol Renal Physiol **305**(5): F645-652.

Kobayashi, T. and P. Cohen (1999). "Activation of serum- and glucocorticoid-regulated kinase by agonists that activate phosphatidylinositol 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2." Biochem J **339**: 10.

Leon, D. A., H. O. Lithell, D. Vagero, I. Koupilova, R. Mohsen, L. Berglund, U. B. Lithell and P. M. McKeigue (1998). "Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15 000 Swedish men and women born 1915-29." BMJ **317**(7153): 241-245.

Little, M. H. and A. P. McMahon (2012). "Mammalian kidney development: principles, progress, and projections." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(5).

Liu, R., J. Pittner and A. E. Persson (2002). "Changes of cell volume and nitric oxide concentration in macula densa cells caused by changes in luminal NaCl concentration." J Am Soc Nephrol **13**(11): 2688-2696.

Lu, C., S. Pribanic, A. Debonneville, C. Jiang and D. Rotin (2007). "The PY motif of ENaC, mutated in Liddle syndrome, regulates channel internalization, sorting and mobilization from subapical pool." Traffic **8**(9): 1246-1264.

Machura, K., B. Neubauer, D. Stepan, R. Kettl, A. Grobete and A. Kurtz (2012). "Role of blood pressure in mediating the influence of salt intake on renin expression in the kidney." Am J Physiol Renal Physiol **302**(10): F1278-1285.

Marieb, E. N. (2005). Human Anatomy and Physiology. Upper Saddle River, NJ, Pearson Benjamin Cummings.

Martin-Gronert, M. S., J. L. Tarry-Adkins, R. L. Cripps, J. H. Chen and S. E. Ozanne (2008). "Maternal protein restriction leads to early life alterations in the expression of key molecules involved in the aging process in rat offspring." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **294**(2): R494-500.

Martin, J. A., Hamilton, Brady E., Ventura, Stephanie J., Osterman, Michelle J.K., Mathews, T.J. (2013). "Births: Final Data for 2011." National Vital Statistics Reports **62**(1).

Mathers, J. C. and J. McKay (2009). Epigenetics – Potential Contribution to Fetal Programming. Early Nutrition Programming and Health Outcomes in Later Life. B. Koletzko, T. Decsi, D. Molnár and A. Hunt, Springer Netherlands. **646**: 119-123.

Maunsbach, A. B., D. Marples, E. Chin, G. Ning, C. Bondy, P. Agre and S. Nielsen (1997). "Aquaporin-1 water channel expression in human kidney." J Am Soc Nephrol **8**(1): 1-14.

McCormick, J. A., V. Bhalla, A. C. Pao and D. Pearce (2005). "SGK1: a rapid aldosterone-induced regulator of renal sodium reabsorption." Physiology (Bethesda) **20**: 134-139.

McDougal, W. S., A. J. Wein, L. R. Kavoussi, A. C. Novick, A. W. Partin, C. A. Peters and P. Ramchandani (2011). Campbell-Walsh Urology 10th Edition Review, Elsevier Health Sciences.

McEneaney, V., B. J. Harvey and W. Thomas (2007). "Aldosterone rapidly activates protein kinase D via a mineralocorticoid receptor/EGFR trans-activation pathway in the M1 kidney CCD cell line." J Steroid Biochem Mol Biol **107**(3-5): 180-190.

Menendez-Castro, C., K. F. Hilgers, K. Amann, C. Daniel, N. Cordasic, R. Wachtveitl, F. Fahlbusch, C. Plank, J. Dotsch, W. Rascher and A. Hartner (2012). "Intrauterine growth restriction leads to a dysregulation of Wilms' tumour suppressor gene 1 (WT1) and to early podocyte alterations." Nephrol Dial Transplant.

Militello, M., E. M. Pappalardo, S. Ermito, A. Dinatale, A. Cavaliere and S. Carrara (2009). "Obstetric management of IUGR." J Prenat Med **3**(1): 6-9.

Mironova, E., V. Bugay, O. Pochynyuk, A. Staruschenko and J. D. Stockand (2013). "Recording ion channels in isolated, split-opened tubules." Methods Mol Biol **998**: 341-353.

Moritz, K. M. and E. M. Wintour (1999). "Functional development of the meso- and metanephros." Pediatr Nephrol **13**(2): 171-178.

Muller, O. G., R. G. Parnova, G. Centeno, B. C. Rossier, D. Firsov and J.-D. Horisberger (2003). "Mineralocorticoid Effects in the Kidney: Correlation between α ENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA Expression and Urinary Excretion of Na⁺ and K⁺." Journal of the American Society of Nephrology **14**(5): 1107-1115.

Mulroney, S. E., C. Woda, M. Johnson and C. Pesce (1999). "Gender differences in renal growth and function after uninephrectomy in adult rats." Kidney Int **56**(3): 944-953.

Mulrow, P. J. and W. F. Ganong (1961). "Stimulation of Aldosterone Secretion by Angiotensin II - a Preliminary Report." Yale Journal of Biology and Medicine **33**(5): 386-&.

Naray-Fejes-Toth, A. and G. Fejes-Toth (2000). "The sgk, an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells, regulates the epithelial sodium channel." Kidney Int **57**(4): 1290-1294.

Neugarten, J., A. Acharya and S. R. Silbiger (2000). "Effect of gender on the progression of nondiabetic renal disease: a meta-analysis." J Am Soc Nephrol **11**(2): 319-329.

OECD (2011). "Health at a Glance 2011: OECD Indicators." OECD Publishing
http://dx.doi.org/10.1787/health_glance-2011-en.

Ojeda, N. B., D. Grigore, E. B. Robertson and B. T. Alexander (2007). "Estrogen protects against increased blood pressure in postpubertal female growth restricted offspring." Hypertension **50**(4): 679-685.

Ojeda, N. B., D. Grigore, L. L. Yanes, R. Iliescu, E. B. Robertson, H. Zhang and B. T. Alexander (2007). "Testosterone contributes to marked elevations in mean arterial pressure in adult male intrauterine growth restricted offspring." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **292**(2): R758-763.

Ono, S., E. Kusano, S. Muto, Y. Ando and Y. Asano (1997). "A low-Na⁺ diet enhances expression of mRNA for epithelial Na⁺ channel in rat renal inner medulla." Pflugers Arch **434**(6): 756-763.

Ozaki, T., H. Nishina, M. A. Hanson and L. Poston (2001). "Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring." J Physiol **530**(Pt 1): 141-152.

Pacha, J., G. Frindt, L. Antonian, R. B. Silver and L. G. Palmer (1993). "Regulation of Na channels of the rat cortical collecting tubule by aldosterone." J Gen Physiol **102**(1): 25-42.

Park, J., M. L. Leong, P. Buse, A. C. Maiyar, G. L. Firestone and B. A. Hemmings (1999). "Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway." EMBO J **18**(11): 3024-3033.

Peti-Peterdi, J. and R. C. Harris (2010). "Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release." J Am Soc Nephrol **21**(7): 1093-1096.

Peti-Peterdi, J., P. Komlosi, A. L. Fuson, Y. Guan, A. Schneider, Z. Qi, R. Redha, L. Rosivall, M. D. Breyer and P. D. Bell (2003). "Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE2 release from macula densa cells." Journal of Clinical Investigation **112**(1): 76-82.

Pham, T. D., N. K. MacLennan, C. T. Chiu, G. S. Laksana, J. L. Hsu and R. H. Lane (2003). "Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **285**(5): R962-970.

Qin, W., A. E. Rudolph, B. R. Bond, R. Rocha, E. A. Blomme, J. J. Goellner, J. W. Funder and E. G. McMahon (2003). "Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure." Circ Res **93**(1): 69-76.

Rennke, H. G., B. M. Denker and B. D. Rose (2007). Renal pathophysiology : the essentials. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Reynolds, R. M., B. R. Walker, D. I. Phillips, E. M. Dennison, R. Fraser, S. M. Mackenzie, E. Davies and J. M. Connell (2009). "Programming of hypertension: associations of plasma aldosterone in adult men and women with birthweight, cortisol, and blood pressure." Hypertension **53**(6): 932-936.

Rhind, S. M., M. T. Rae and A. N. Brooks (2001). "Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis." Reproduction **122**(2): 205-214.

Robert-Nicoud, M., M. Flahaut, J. M. Elalouf, M. Nicod, M. Salinas, M. Bens, A. Doucet, P. Wincker, F. Artiguenave, J. D. Horisberger, A. Vandewalle, B. C. Rossier and D. Firsov (2001). "Transcriptome of a mouse kidney cortical collecting duct cell line: effects of aldosterone and vasopressin." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2712-2716.

Rodeck, C. H. and M. J. Whittle (2009). Fetal Medicine: Basic Science and Clinical Practice, Churchill Livingstone.

Roy-Clavel, E., S. Picard, J. St-Louis and M. Brochu (1999). "Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats." Am J Obstet Gynecol **180**(3 Pt 1): 608-613.

Rusai, K., A. Prokai, B. Szebeni, K. Meszaros, A. Fekete, B. Szalay, A. Vannay, P. Degrell, V. Muller, T. Tulassay and A. J. Szabo (2011). "Gender differences in serum and glucocorticoid regulated kinase-1 (SGK-1) expression during renal ischemia/reperfusion injury." Cell Physiol Biochem **27**(6): 727-738.

Ruster, M., M. Sommer, G. Stein, K. Bauer, B. Walter, G. Wolf and R. Bauer (2006). "Renal Angiotensin receptor type 1 and 2 upregulation in intrauterine growth restriction of newborn piglets." Cells Tissues Organs **182**(2): 106-114.

Sahajpal, V. and N. Ashton (2003). "Renal function and angiotensin AT1 receptor expression in young rats following intrauterine exposure to a maternal low-protein diet." Clin Sci (Lond) **104**(6): 607-614.

Salas, S. P., G. Marshall, B. L. Gutierrez and P. Rosso (2006). "Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with preeclampsia or fetal growth restriction." Hypertension **47**(2): 203-208.

Salas, S. P., P. Rosso, R. Espinoza, J. A. Robert, G. Valdes and E. Donoso (1993). "Maternal plasma volume expansion and hormonal changes in women with idiopathic fetal growth retardation." Obstet Gynecol **81**(6): 1029-1033.

Saxén, L. and H. Sariola (1987). "Early organogenesis of the kidney." Pediatric Nephrology **1**(3): 385-392.

Schneider, E. G., K. J. Radke, D. A. Ulderich and R. E. Taylor, Jr. (1985). "Effect of osmolality on aldosterone secretion." Endocrinology **116**(4): 1621-1626.

Schnermann, J. B., T. Traynor, T. Yang, Y. G. Huang, M. I. Oliverio, T. Coffman and J. P. Briggs (1997). "Absence of tubuloglomerular feedback responses in AT1A receptor-deficient mice." Am J Physiol **273**(2 Pt 2): F315-320.

Schreuder, M. F., J. R. Nyengaard, M. Fodor, J. A. van Wijk and H. A. Delemarre-van de Waal (2005). "Glomerular number and function are influenced by spontaneous and induced low birth weight in rats." J Am Soc Nephrol **16**(10): 2913-2919.

Sehgal, A., T. Doctor and S. Menahem (2013). "Cardiac function and arterial biophysical properties in small for gestational age infants: postnatal manifestations of fetal programming." J Pediatr **163**(5): 1296-1300.

Sequeira Lopez, M. L., E. S. Pentz, T. Nomasa, O. Smithies and R. A. Gomez (2004). "Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened." Dev Cell **6**(5): 719-728.

Shen, Q., H. Xu, L. M. Wei, J. Chen, H. M. Liu and W. Guo (2010). "A comparative proteomic study of nephrogenesis in intrauterine growth restriction." Pediatr Nephrol **25**(6): 1063-1072.

Sherwood, L. and C. Learning (2010). Human Physiology: From Cells to Systems: From Cells to Systems, Brooks/Cole, Cengage Learning.

Shi, H., C. Asher, A. Chigaev, Y. Yung, E. Reuveny, R. Seger and H. Garty (2002). "Interactions of beta and gamma ENaC with Nedd4 can be facilitated by an ERK-mediated phosphorylation." J Biol Chem **277**(16): 13539-13547.

Silver, H. M., M. Seebeck and R. Carlson (1998). "Comparison of total blood volume in normal, preeclamptic, and nonproteinuric gestational hypertensive pregnancy by simultaneous measurement of red blood cell and plasma volumes." Am J Obstet Gynecol **179**(1): 87-93.

Snyder, P. M., D. R. Olson and B. C. Thomas (2002). "Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na⁺ channel." J Biol Chem **277**(1): 5-8.

Sohi, G., K. Marchand, A. Revesz, E. Arany and D. B. Hardy (2011). "Maternal protein restriction elevates cholesterol in adult rat offspring due to repressive changes in histone modifications at the cholesterol 7 α -hydroxylase promoter." Mol Endocrinol **25**(5): 785-798.

Somm, E., D. M. Vauthay, A. Guerardel, A. Toulotte, P. Cettour-Rose, P. Klee, P. Meda, M. L. Aubert, P. S. Huppi and V. M. Schwitzgebel (2012). "Early metabolic defects in dexamethasone-exposed and undernourished intrauterine growth restricted rats." PLoS One **7**(11): e50131.

Soundararajan, R., D. Melters, I. C. Shih, J. Wang and D. Pearce (2009). "Epithelial sodium channel regulated by differential composition of a signaling complex." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(19): 7804-7809.

Soundararajan, R., D. Pearce and T. Ziera (2012). "The role of the ENaC-regulatory complex in aldosterone-mediated sodium transport." Mol Cell Endocrinol **350**(2): 242-247.

Soundararajan, R., J. Wang, D. Melters and D. Pearce (2010). "Glucocorticoid-induced Leucine zipper 1 stimulates the epithelial sodium channel by regulating serum- and glucocorticoid-induced kinase 1 stability and subcellular localization." J Biol Chem **285**(51): 39905-39913.

Soundararajan, R., T. T. Zhang, J. Wang, A. Vandewalle and D. Pearce (2005). "A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport." J Biol Chem **280**(48): 39970-39981.

Soundararajan, R., T. Ziera, E. Koo, K. Ling, J. Wang, S. A. Borden and D. Pearce (2012). "Scaffold protein connector enhancer of kinase suppressor of Ras isoform 3 (CNK3)

coordinates assembly of a multiprotein epithelial sodium channel (ENaC)-regulatory complex." J Biol Chem **287**(39): 33014-33025.

Spence, D., M. C. Stewart, F. A. Alderdice, C. C. Patterson and H. L. Halliday (2012). "Intra-uterine growth restriction and increased risk of hypertension in adult life: a follow-up study of 50-year-olds." Public Health **126**(7): 561-565.

St-Louis, J., B. Sicotte, A. Beausejour and M. Brochu (2006). "Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake." Reproduction **131**(2): 331-339.

Thorn, S. R., T. R. Regnault, L. D. Brown, P. J. Rozance, J. Keng, M. Roper, R. B. Wilkening, W. W. Hay, Jr. and J. E. Friedman (2009). "Intrauterine growth restriction increases fetal hepatic gluconeogenic capacity and reduces messenger ribonucleic acid translation initiation and nutrient sensing in fetal liver and skeletal muscle." Endocrinology **150**(7): 3021-3030.

Vaccari, B., F. F. Mesquita, J. A. Gontijo and P. A. Boer (2013). "Fetal kidney programming by severe food restriction: Effects on structure, hormonal receptor expression and urinary sodium excretion in rats." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.

Vehaskari, V. M., D. H. Aviles and J. Manning (2001). "Prenatal programming of adult hypertension in the rat." Kidney Int **59**(1): 238-245.

Vehaskari, V. M., T. Stewart, D. Lafont, C. Soye, D. Seth and J. Manning (2004). "Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension." Am J Physiol Renal Physiol **287**(2): F262-267.

Verrey, F., J. P. Kraehenbuhl and B. C. Rossier (1989). "Aldosterone induces a rapid increase in the rate of Na,K-ATPase gene transcription in cultured kidney cells." Mol Endocrinol **3**(9): 1369-1376.

Visentin, S., M. Bertin, M. Rampon, D. Trevisanuto, V. Zanardo and E. Cosmi (2012). Infants Born with Intrauterine Growth Restriction: Renal and Cardiovascular Follow-Up. Contemporary Pediatrics. D. Ö. Özdemir.

Vize, P. D., A. S. Woolf and J. B. L. Bard (2003). The Kidney: From Normal Development to Congenital Disease, Elsevier Science.

Vo, T. X., A. Revesz, G. Sohi, N. Ma and D. B. Hardy (2013). "Maternal protein restriction leads to enhanced hepatic gluconeogenic gene expression in adult male rat offspring due to impaired expression of the liver X receptor." J Endocrinol **218**(1): 85-97.

von Eiff, A. W., H. M. Lutz, J. Gries and R. Kretzschmar (1985). "The protective mechanism of estrogen on high blood pressure." Basic Res Cardiol **80**(2): 191-201.

Wagner, C. A., U. Lukewille, P. Valles, S. Breton, D. Brown, G. H. Giebisch and J. P. Geibel (2003). "A rapid enzymatic method for the isolation of defined kidney tubule fragments from mouse." Pflugers Arch **446**(5): 623-632.

Welch, W. J. and C. S. Wilcox (1990). "Feedback responses during sequential inhibition of angiotensin and thromboxane." Am J Physiol **258**(3 Pt 2): F457-466.

Williams, J. S. (2003). "50th Anniversary of Aldosterone." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **88**(>6): 2364-2372.

Woods, L. L. and R. Rasch (1998). "Perinatal ANG II programs adult blood pressure, glomerular number, and renal function in rats." Am J Physiol **275**(5 Pt 2): R1593-1599.

Woolf, A. S., P. J. D. Winyard, M. M. Hermanns and S. J. M. Welham (2003). Maldevelopment of the human kidney and lower urinary tract: an overview. The kidney: from normal development to congenital disease. P. D. Vize, A. S. Woolf and J. B. L. Bard. London, Academic Press: 377-393.

Wu, Z., C. Maric, D. M. Roesch, W. Zheng, J. G. Verbalis and K. Sandberg (2003). "Estrogen regulates adrenal angiotensin AT1 receptors by modulating AT1 receptor translation."

Endocrinology **144**(7): 3251-3261.

Yuan, Q. X., J. Y. Zhou, L. P. Teng, C. P. Liu, J. Guo, L. J. Liu, W. De, K. F. Xu, X. D. Mao and C. Liu (2010). "Intrauterine growth retardation leads to the functional change of insulin secretion in the newborn rats." Horm Metab Res **42**(7): 491-495.

Zanardo, V., T. Fanelli, G. Weiner, V. Fanos, M. Zaninotto, S. Visentin, F. Cavallin, D. Trevisanuto and E. Cosmi (2011). "Intrauterine growth restriction is associated with persistent aortic wall thickening and glomerular proteinuria during infancy." Kidney Int **80**(1): 119-123.

Zeng, Y., P. Gu, K. Liu and P. Huang (2013). "Maternal protein restriction in rats leads to reduced PGC-1alpha expression via altered DNA methylation in skeletal muscle." Mol Med Rep **7**(1): 306-312.

Zhang, W., X. Xia, M. R. Reisenauer, T. Rieg, F. Lang, D. Kuhl, V. Vallon and B. C. Kone (2007). "Aldosterone-induced Sgk1 relieves Dot1a-Af9-mediated transcriptional repression of epithelial Na⁺ channel alpha." J Clin Invest **117**(3): 773-783.

Zhou, R., S. V. Patel and P. M. Snyder (2007). "Nedd4-2 catalyzes ubiquitination and degradation of cell surface ENaC." J Biol Chem **282**(28): 20207-20212.

Zhou, R. and P. M. Snyder (2005). "Nedd4-2 phosphorylation induces serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK) ubiquitination and degradation." J Biol Chem **280**(6): 4518-4523.

Ziera, T., H. Irlbacher, A. Fromm, C. Latouche, S. M. Krug, M. Fromm, F. Jaisser and S. A. Borden (2009). "Cnksr3 is a direct mineralocorticoid receptor target gene and plays a key role in the regulation of the epithelial sodium channel." FASEB J **23**(11): 3936-3946.

Zohdi, V., K. M. Moritz, K. J. Bubb, M. L. Cock, N. Wreford, R. Harding and M. J. Black (2007). "Nephrogenesis and the renal renin-angiotensin system in fetal sheep: effects of

intrauterine growth restriction during late gestation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol
293(3): R1267-1273.

